

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA
TROMBOCITOPENIA Y USO DE LA MISMA

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención pertenece al campo técnico de los ácidos nucleicos, particularmente en lo que se refiere a las moléculas bicatenarias de ácido nucleico asociadas con la activación de genes, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico activador pequeño, usos de las moléculas de ácido nucleico activador pequeño en la activación/regulación al alza de la transcripción del gen de la trombopoyetina (*THPO*, *TPO*) y usos de las mismas en el tratamiento de enfermedades y afecciones, como la trombocitopenia, relacionadas con la deficiencia o insuficiencia de la proteína THPO.

ANTECEDENTES

[0002] El trombocito es uno de los componentes sanguíneos de la sangre periférica que deriva de los megacariocitos sin núcleo de la médula ósea (Machlus, Thon e Italiano 2014). La función principal del trombocito es promover la hemostasia, acelerar la coagulación y mantener la integridad de las paredes capilares, al tiempo que desempeña un papel importante en la hemostasia fisiológica y en la trombosis patológica (Laki 1972).

[0003] La trombocitopenia es una enfermedad en la que el número de plaquetas en la sangre periférica está anormalmente reducido y se caracteriza clínicamente por equimosis, hemorragias en las mucosas o hemorragias intracraneales, lo que pone en peligro la vida de los pacientes que padecen esta enfermedad. Se considera que existe trombocitopenia cuando la concentración de plaquetas es inferior a $100 \times 10^9/l$ por recuento directo de plaquetas en sangre (Kuter 2009). La hemorragia espontánea, que se manifiesta como una púrpura subcutánea, se produce con frecuencia cuando la concentración de plaquetas es inferior a $50 \times 10^9/l$. Cuando la concentración de plaquetas es inferior a $20 \times 10^9/l$, la afección del paciente puede poner en peligro su vida, especialmente debido a un traumatismo o una hemorragia intracraneal repentina, una hemorragia gastrointestinal, etcétera.

[0004] La trombocitopenia puede clasificarse en 3 categorías en función de la patogenia: mielo-trombocitopenia, aumento de la destrucción de plaquetas periféricas y secuestro esplénico (Seo et al. 2017). Los factores que provocan una reducción de las plaquetas comprenden la trombocitopenia congénita (hereditaria) y la trombocitopenia adquirida. Actualmente, se ha descubierto que la trombocitopenia hereditaria puede estar causada por al menos mutaciones en genes, como *MPL*, *GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *MYH9*, *FLII*, *NBEAL2*, *WAS*, *GATA1*, *PRKACG*, *GFI1b*, *STIM1*, *FYB*, *SLFN14*, *ETV6*, *DIAPH1* y *SRC*. La trombocitopenia causada por factores adquiridos incluye la trombocitopenia causada por anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos, leucemia, fármacos, infecciones, enfermedades tumorales, radioterapia, trasplante de médula ósea, enfermedades hepáticas crónicas, y la trombocitopenia inmunitaria (también llamada púrpura trombocitopénica

idiopática [PTI]). Los factores que causan un aumento de la destrucción de las plaquetas comprenden la trombocitopenia trombótica, la trombocitopenia inducida por heparina, la trombocitopenia inducida por fármacos, la PTI y la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Hassan y Waller 2015). La trombocitopenia también puede ser causada por secuestro debido a esplenomegalia, transfusión de sangre de banco con bajo contenido de plaquetas, entre otras causas.

[0005] La trombopoyetina (THPO), también conocida como factor de crecimiento y de desarrollo de los megacariocitos (MGDF) o ligando C-MPL, es una hormona glucoproteica codificada por el gen *THPO* humano y producida y secretada, principalmente, por el hígado y el riñón (de Sauvage et al. 1994). El gen *THPO* humano está situado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.3-3q27.2) y codifica una proteína precursora que contiene 353 aminoácidos y presenta un peso molecular de 36 kDa. Tras la eliminación del péptido señal que contiene 21 aminoácidos, los 332 aminoácidos restantes se glicosilan para formar una glicoproteína de 95 kDa que se libera a la circulación para unirse al receptor C-MPL de los megacariocitos y las plaquetas estimulando la formación y diferenciación de los megacariocitos y promoviendo la trombopoyesis (Bartley et al. 1994). El gen *Thpo* de ratón (también conocido como *Mr*, *Tpo*, *Mgdf*, *Mpllg*) es homólogo al gen *THPO* humano y codifica la trombopoyetina de ratón. El C-MPL se descubrió por primera vez en ratones infectados con el virus de la leucemia mieloproliferativa (MPLV) y, luego, se clonó el gen *C-MPL* humano (Mignotte et al. 1994).

[0006] El tratamiento clínico de primera línea de la trombocitopenia consiste principalmente en aplicar inyecciones intravenosas de glucocorticoides (altas dosis de dexametasona o prednisona) y gammaglobulina (Ig IV). Si la terapia de primera línea fracasa o no se puede mantener, se elegiría entonces la terapia de segunda línea, como el tratamiento farmacológico o la esplenectomía. El tratamiento farmacológico es el método de tratamiento de segunda línea utilizado con mayor frecuencia en la actualidad, ya que la esplenectomía puede provocar infecciones, recaídas a largo plazo, hospitalizaciones prolongadas y un alto riesgo de muerte (Provan et al. 2010).

[0007] Los fármacos utilizados actualmente para tratar la trombocitopenia son, principalmente, agentes trombopoyéticos que estimulan los megacariocitos para que crezcan, maduren y produzcan plaquetas, complementando la THPO o simulando la función de la misma. Estos agentes trombopoyéticos incluyen dos clases principales, la trombopoyetina humana recombinante (rhTHPO) y el agonista del receptor de C-MPL (C-MPL-RA). Inicialmente, los péptidos homólogos a la THPO endógena (agentes trombopoyéticos de primera generación) habían mostrado buenos resultados en los primeros estudios clínicos en pacientes con trombocitopenia. Sin embargo, se ha descubierto, en estudios clínicos posteriores, que el organismo puede producir anticuerpos neutralizantes que reaccionen de forma cruzada con la THPO endógena, dando lugar a una trombocitopenia persistente (Basser 2002; Solberg 2005). Además, como la THPO recombinante

producida *in vitro* no puede glicosilarse completamente, su función trombopoyética es limitada. Los agentes trombopoyéticos de segunda generación son principalmente C-MMPL-AR, e incluyen eltrombopag y romiplostim aprobados por la FDA en 2008 para el tratamiento de la PTI y avatrombopag aprobado por la FDA y comercializado para el tratamiento de la PTI en 2018. Los fármacos agonistas de C-MPL tienen algunos efectos curativos; sin embargo, se han asociado a diversas complicaciones y reacciones de retirada.

[0008] Aunque los fármacos mencionados anteriormente presentan algunos efectos curativos al complementar o imitar la función de la THPO para promover la trombopoyesis o simular la función de la misma, estos fármacos tienen ciertos defectos, y todos se incluyen en tratamientos de segunda línea y se utilizan principalmente para tratar la PTI. Para tratar eficazmente la trombocitopenia causada por diversas razones, es necesario desarrollar métodos de tratamiento basados en un mecanismo nuevo.

COMPENDIO

[0009] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico activador pequeño basada en un mecanismo de activación del ARN, que promueva la trombopoyesis o trate una enfermedad y afección relacionada con la deficiencia o insuficiencia de la proteína THPO o la trombocitopenia causada por diversas razones, como la trombocitopenia inducida por fármacos y la trombocitopenia inmunitaria, mediante la activación/regulación al alza de la transcripción del gen *THPO* para aumentar la expresión de la proteína THPO.

[0010] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición o formulación que comprenda la molécula de ácido nucleico activador pequeño.

[0011] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de una molécula de ácido nucleico activador pequeño o una composición o formulación que comprenda la misma en la preparación de un fármaco para activar/regular al alza la expresión del gen *THPO* en una célula.

[0012] Y otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para activar/regular al alza la expresión del gen *Thpo/THPO* en una célula.

[0013] Y otro objetivo más de la presente invención es proporcionar el uso de una molécula de ácido nucleico activador pequeño o una composición o formulación de la misma en la preparación de un fármaco para tratar la trombocitopenia y/o una enfermedad o afección relacionada con la deficiencia o insuficiencia de la proteína THPO, o en un método para tratar la trombocitopenia y/o una enfermedad o afección relacionada con la deficiencia o insuficiencia de la proteína THPO.

[0014] Y otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un sitio diana aislado de la molécula de ácido nucleico activador pequeño del gen *Thpo/THPO*, en el que el sitio diana comprende o se selecciona de entre cualquier secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud

en cualquier secuencia establecida en las ID. SEC. N.º: 2 a ID. SEC. N.º: 4 y las ID. SEC. N.º: 601 a ID. SEC. N.º: 605, o una secuencia que tenga al menos el 75 %, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % de homología con una secuencia que consiste en cualquiera de las secuencias continuas mencionadas de 16 a 35 nucleótidos de longitud.

[0015] Solución técnica

[0016] En un aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico activador pequeño (por ejemplo, una molécula de ARN activador pequeño, ARNap) que activa/regula al alza la expresión del gen *Thpo* en una célula de ratón, en la que una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño presenta por lo menos un 75 % de homología o complementariedad con cualquier secuencia de ácido nucleico de 16 a 35 nucleótidos de longitud en una región promotora de un gen *Thpo* de ratón, activando o regulando al alza así la expresión del gen, en la que la región promotora comprende 500 nucleótidos secuencia arriba de un sitio de inicio de la transcripción. Específicamente, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño comprende o se selecciona de entre una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o un 100 %) de homología o complementariedad con una secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud en las posiciones -493 a -356 (punto caliente 1, ID. SEC. N.º: 2), las posiciones -273 a -183 (punto caliente 2, ID. SEC. N.º: 3), o las posiciones -164 a -80 (punto caliente 3, ID. SEC. N.º: 4) secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *Thpo*. Más específicamente, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 200 e ID. SEC. N.º: 296. En una modalidad específica, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 200 e ID. SEC. N.º: 296. En otra modalidad, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por

ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 200 e ID. SEC. N.º: 296. Y en otra modalidad, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención es una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 200 e ID. SEC. N.º: 296.

[0017] La molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una molécula bicatenaria de ácido nucleico activador pequeño, como la molécula de ARN activador pequeño (ARNap), dirigida a la región promotora de un gen *Thpo* de ratón que comprende una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico, en la que la primera cadena de ácido nucleico presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud en las posiciones -493 a -356 (punto caliente 1, ID. SEC. N.º: 2), posiciones -273 a -183 (punto caliente 2, ID. SEC. N.º: 3) o posiciones -164 a -80 (punto caliente 3, ID. SEC. N.º: 4) del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *Thpo*, y la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico pueden formar complementariamente una estructura bicatenaria de ácido nucleico capaz de activar la expresión del gen *Thpo* en una célula.

[0018] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico activador pequeño (por ejemplo, una molécula de ARN activador pequeño, ARNap) que activa/regula al alza la expresión del gen *THPO* en una célula humana, en la que una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño presenta por lo menos un 75 % de homología o complementariedad con cualquier secuencia de ácido nucleico de 16 a 35 nucleótidos de longitud en una región promotora del gen *THPO* humano, activando o regulando al alza así la expresión del gen, en la que la región promotora comprende 500 nucleótidos secuencia arriba de un sitio de inicio de la transcripción. Específicamente, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño comprende o se selecciona de entre una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o un 100 %) de homología o complementariedad con una secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud en

las posiciones -1339 a -1044 (punto caliente 1, ID. SEC. N.º: 601), las posiciones -1027 a -903 (punto caliente 2, ID. SEC. N.º: 602), las posiciones -861 a -754 (punto caliente 3, ID. SEC. N.º: 603), las posiciones -728 a -611 (punto caliente 4, ID. SEC. N.º: 604) o las posiciones -593 a -1 (punto caliente 5, ID. SEC. N.º: 605) secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *THPO*. Más específicamente, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 606 e ID. SEC. N.º: 1047. En una modalidad específica, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 606 e ID. SEC. N.º: 1047. En otra modalidad, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 606 e ID. SEC. N.º: 1047. Y en otra modalidad, una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención es una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 606 e ID. SEC. N.º: 1047.

[0019] La molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una molécula bicatenaria de ácido nucleico activador pequeño, como la molécula de ARN activador pequeño (ARNap), dirigida a la región promotora de un gen *THPO* humano que comprende una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico, en la que la primera cadena de ácido nucleico presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de homología o complementariedad con cualquier secuencia continua

de 16 a 35 nucleótidos de longitud en las posiciones -1339 a -1044 (punto caliente 1, ID. SEC. N.º: 601), posiciones -1027 a -903 (punto caliente 2, ID. SEC. N.º: 602) o posiciones -861 a -754 (punto caliente 3, ID. SEC. N.º: 603) posiciones -728 a -611 (punto caliente 4, ID. SEC. N.º: 604) o posiciones -593 a -1 (punto caliente 5, ID. SEC. N.º: 605) secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *THPO*, y la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico pueden formar complementariamente una estructura bicatenaria de ácido nucleico capaz de activar la expresión del gen *THPO* en una célula.

[0020] La primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención pueden estar presentes en dos cadenas de ácido nucleico diferentes o en la misma cadena de ácido nucleico. Cuando la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico están ubicadas en dos cadenas diferentes, por lo menos una cadena de la molécula de ácido nucleico activador pequeño puede presentar una prolongación en cualquiera de los extremos terminales 5' y/o 3', por ejemplo, prolongaciones de 0 a 6 nucleótidos de longitud en el extremo terminal 3', de forma que las prolongaciones son de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, ambas cadenas de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención presentan prolongaciones; más preferiblemente, el extremo terminal 3' de ambas cadenas de la molécula de ácido nucleico activador pequeño puede presentar prolongaciones de 0 a 6 nucleótidos de longitud, por ejemplo, prolongaciones de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de longitud; más preferiblemente, prolongaciones de 2 o 3 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, el nucleótido de la prolongación es dT.

[0021] La molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención también puede comprender una molécula de ácido nucleico activador pequeño capaz de formar una estructura bicatenaria en horquilla entre regiones complementarias, por ejemplo, una molécula monocatenaria de ARN activador pequeño. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una molécula monocatenaria de ARN activador pequeño dirigida a la región promotora del gen *THPO*, en la que la molécula monocatenaria de ácido nucleico activador pequeño puede formar una estructura bicatenaria en horquilla entre las regiones complementarias. Preferiblemente, cuando la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico están presentes en la misma cadena de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede ser una molécula monocatenaria de ácido nucleico en horquilla, en la que la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico presentan regiones complementarias capaces de formar una estructura bicatenaria de ácido nucleico, y la estructura bicatenaria de ácido nucleico puede promover la expresión del gen *THPO* en una célula con, por ejemplo, un mecanismo de activación del ARN.

[0022] En las moléculas de ácido nucleico activador pequeño mencionadas anteriormente, la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico pueden presentar de 16 a 35 nucleótidos (por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos) de longitud.

[0023] En una modalidad, la primera cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 6-102, y la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 103-199. En una modalidad, la primera cadena de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 6-102, o consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 6-142; la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 103-199, o consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 103-199.

En una modalidad específica, la primera cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede comprender o ser seleccionada de entre cualquier secuencia de nucleótidos establecida en las ID. SEC. N.º: 6-102, y la segunda cadena puede comprender o ser seleccionada de entre cualquier secuencia de nucleótidos establecida en las ID. SEC. N.º: 103-199. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente se puede sintetizar, transcribir *in vitro* o expresar mediante un vector.

[0024] En otra modalidad, la primera cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1048 e ID. SEC. N.º: 1489, y la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1490 e ID. SEC. N.º: 1931. En una modalidad, la primera cadena de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1048 e ID. SEC. N.º: 1489, o consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1048 e ID. SEC. N.º: 1489; la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1490 e ID. SEC. N.º: 1931, o consiste en una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos un 75 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 79 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %,

aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 %) de identidad u homología con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada de entre las ID. SEC. N.º: 1490 e ID. SEC. N.º: 1931. En una modalidad específica, la primera cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede comprender o ser seleccionada de entre cualquier secuencia de nucleótidos establecida en las ID. SEC. N.º: 1048 a ID. SEC. N.º: 1489, y la segunda cadena puede comprender o ser seleccionada de entre cualquier secuencia de nucleótidos establecida en las ID. SEC. N.º: 1490 a ID. SEC. N.º: 1931. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente se puede sintetizar, transcribir *in vitro* o expresar mediante un vector.

[0025] Todos los nucleótidos en la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente pueden ser nucleótidos naturales no modificados químicamente o pueden comprender por lo menos una modificación. En una modalidad, la modificación en la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente puede comprender una modificación química, por ejemplo, por lo menos un nucleótido puede presentar una modificación química, y la modificación química utilizada en la presente invención puede comprender o ser seleccionada entre una o más combinaciones de las siguientes modificaciones:

[0026] (1) modificación de un enlace fosfodiéster de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico activador pequeño;

[0027] (2) modificación de 2'-OH de una ribosa de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico activador pequeño;

[0028] (3) modificación de una base de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico activador pequeño; y

[0029] (4) al menos un nucleótido de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico activador pequeño que es un ácido nucleico bloqueado.

[0030] Las modificaciones químicas descritas en la presente son conocidas para los expertos en la técnica, y la modificación del enlace fosfodiéster se refiere a la modificación del oxígeno del enlace fosfodiéster, que incluye, entre otros, la modificación de fosforotioato y la modificación de boranofosfato. Ambas modificaciones pueden estabilizar una estructura de ARN^{ap} y mantener la alta especificidad y la alta afinidad en el apareamiento de bases.

[0031] La modificación de la ribosa se refiere a la modificación del 2'-OH de la pentosa de un nucleótido, es decir, la introducción de algunos sustituyentes en las posiciones hidroxilo de la ribosa, por ejemplo, que incluye, entre otros, la modificación de 2'-fluoro, la modificación de 2'-oximetilo, la modificación de 2'-oxietilideno metoxi, la modificación de 2,4'-dinitrofenol, el ácido nucleico bloqueado (LNA), la modificación de 2'-amino, la modificación de 2'-desoxi, entre otras.

[0032] La modificación de bases se refiere a la modificación de la base de un nucleótido, por ejemplo, que incluye, entre otros, la modificación de 5'-bromouracilo, la modificación de 5'-yodouracilo, la modificación de N-metiluracilo, la modificación de 2,6-diaminopurina, entre otras.

[0033] Estas modificaciones pueden aumentar la biodisponibilidad de la molécula de ácido nucleico activador pequeño, mejorar la afinidad por una secuencia diana y potenciar la resistencia a hidrólisis por nucleasa en una célula.

[0034] Además, para promover el acceso de una molécula de ácido nucleico activador pequeño a una célula, en base a las modificaciones mencionadas anteriormente, se puede introducir un grupo lipófilo, como el colesterol,) en el extremo terminal de la primera cadena de ácido nucleico y/o la segunda cadena de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico activador pequeño para facilitar la interacción con la región promotora de un gen en el núcleo celular, ya que la membrana celular y la membrana nuclear están compuestas por bicapas lipídicas.

[0035] Después de entrar en contacto con una célula y penetrar en ella, la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede, de manera eficaz, activar o regular al alza la expresión del gen *Thpo/THPO* en la célula, preferiblemente en por lo menos un 10 %.

[0036] Otro aspecto de la presente invención se refiere también a un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la invención. En una modalidad, el ácido nucleico es una molécula de ADN.

[0037] Otro aspecto de la presente invención proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño mencionada anteriormente o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede ser una molécula bicatenaria de ácido nucleico activador pequeño, como una molécula bicatenaria de ARN activador pequeño (ARNap), que se dirige a la región promotora del gen *Thpo/THPO* que comprende una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede ser una molécula monocatenaria de ácido nucleico activador pequeño, como un ácido nucleico monocatenario con estructura en horquilla, dirigida a la región promotora del gen *Thpo/THPO*, en la que el ácido nucleico monocatenario con estructura en horquilla produce una molécula bicatenaria de ARN activador pequeño (ARNap) en una célula después de ser introducida en ella.

[0038] Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica). La composición comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente y, opcionalmente, un transportador farmacéuticamente

aceptable. En una modalidad, el transportador farmacéuticamente aceptable puede comprender o seleccionarse de entre un liposoma, un polímero de alto peso molecular y un polipéptido.

[0039] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, o una célula que comprende una molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención.

[0040] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente, o una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención.

[0041] Otro aspecto de la presente invención se refiere a los usos de la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en la preparación de un fármaco o formulación para activar/regular al alza la expresión del gen *Thpo/THPO* en una célula.

[0042] Otro aspecto de la presente invención se refiere también a un método para activar/regular al alza la expresión del gen *Thpo/THPO* en una célula. El método comprende administrar a una célula la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición o formulación que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención. En una modalidad, el método para activar/regular al alza la expresión del gen *Thpo/THPO* en la célula comprende administrar a la célula la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición o formulación que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención. La célula mencionada

anteriormente comprende una célula de mamífero, por ejemplo, una célula del cuerpo humano, como una célula hepática embrionaria de humano, una célula de hepatocarcinoma humano, como una célula HepG2, y una célula hepática humana, o una célula de ratón, como una célula hepática embrionaria de ratón, como la línea celular embrionaria BNL.CL2, una célula de cáncer hepático de ratón, como la línea celular de cáncer hepático LPC-H12, y una célula hepática primaria de ratón. La célula mencionada anteriormente puede estar *in vitro*, o puede estar presente en el cuerpo de un mamífero, como un ratón o el cuerpo humano.

[0043] La molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención se puede introducir directamente en una célula, o se puede producir en la célula después de introducir una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en una célula. La célula es, preferiblemente, una célula de mamífero, más preferiblemente, una célula humana o de ratón. La célula mencionada anteriormente puede estar *in vitro*, como una línea celular o una cepa celular, o puede presentarse en el cuerpo de un mamífero, como un ratón o un cuerpo humano, y más específicamente, como una célula hepática de ratón o de humano. El cuerpo humano puede tratarse de un paciente que sufra una enfermedad o afección relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO, o un paciente con trombocitopenia por diversas causas. La molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede administrarse a una dosis suficiente para tratar la enfermedad o afección relacionada con una deficiencia en la cantidad de proteína THPO o una expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. Específicamente, la enfermedad o afección relacionada con una deficiencia en la cantidad de proteína THPO o una expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO puede ser la trombocitopenia.

[0044] Otro aspecto de la presente invención proporciona un sitio aislado de acción de una molécula de ácido nucleico activador pequeño del gen *Thpo/THPO*, que presenta cualquier secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud en la región promotora del gen *Thpo/THPO* y, preferiblemente, el sitio de acción comprende o se selecciona de entre cualquier secuencia continua de 16 a 35 nucleótidos de longitud en cualquiera de las secuencias establecidas en las ID. SEC. N.º: 2-4 e ID. SEC. N.º: 601-605. Específicamente, el sitio de acción puede comprender o seleccionarse de entre cualquier secuencia de nucleótidos establecida en las ID. SEC. N.º: 200-296 e ID. SEC. N.º: 606-1047.

[0045] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o afección relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO en un sujeto, como un ser humano o un ratón, o la trombocitopenia, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica una molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención,

una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención. En una modalidad, un método para tratar la trombocitopenia y/o una enfermedad o afección relacionada con una expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO en un sujeto en la presente invención puede comprender la administración al sujeto de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, y otras formulaciones en una dosis terapéutica, en la que las otras formulaciones comprenden, por ejemplo, un compuesto de bajo peso molecular, un anticuerpo, un polipéptido o una proteína, etc. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ratón o un humano. En la presente invención, la trombocitopenia está causada por diversos factores, incluyendo, entre otros, la mielo-trombocitopenia, el aumento de la destrucción de plaquetas periféricas y el secuestro esplénico. Los factores que provocan una reducción de las plaquetas comprenden la trombocitopenia congénita (hereditaria) y la trombocitopenia adquirida. En una modalidad, los factores que causan la trombocitopenia adquirida incluyen, entre otros, la trombocitopenia causada por la anemia aplásica, los síndromes mielodisplásicos, la leucemia, los fármacos, las infecciones, las enfermedades tumorales, la radioterapia, el trasplante de médula ósea y las enfermedades hepáticas crónicas y la trombocitopenia inmunitaria (PTI). Los factores que provocan un aumento de la destrucción de las plaquetas son, entre otros, la trombocitopenia trombótica, la trombocitopenia inducida por heparina, la trombocitopenia inducida por fármacos, la PTI y la púrpura trombocitopénica trombótica. En una modalidad, la trombocitopenia está relacionada con una enfermedad o afección relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. En otra modalidad, la trombocitopenia está relacionada con una expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. La trombocitopenia puede comprender la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. La trombocitopenia descrita en la presente puede estar causada por diversos factores, como la mielo-trombocitopenia, el aumento de la destrucción de plaquetas periféricas y el secuestro por esplenomegalia, como la radioterapia para tratar un tumor, la quimioterapia para tratar un tumor, el trasplante de médula ósea, la enfermedad hepática crónica, la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica y la trombocitopenia hereditaria. La trombocitopenia suele caracterizarse clínicamente por equimosis, cambios en los megacariocitos de la médula ósea, hemorragias de las mucosas o

hemorragias intracraneales, lo que pondrá en peligro la vida de los pacientes con trombocitopenia grave. Cuando las concentraciones de plaquetas son inferiores a $100 \times 10^9/l$ por recuento directo de plaquetas en sangre, se considera que existe trombocitopenia (Kuter 2009). Cuando las concentraciones de plaquetas son inferiores a $50 \times 10^9/l$, se producen con frecuencia hemorragias espontáneas que se manifiestan como una púrpura subcutánea. Cuando las concentraciones de plaquetas son inferiores a $20 \times 10^9/l$, la afección puede poner en peligro la vida del paciente, en caso de sufrir un traumatismo o una hemorragia intracraneal repentina, una hemorragia gastrointestinal, entre otros. En el método de la presente invención, la trombocitopenia en el sujeto puede caracterizarse por una concentración de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$, inferior a $50 \times 10^9/l$ o inferior a $20 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre. En una modalidad, una enfermedad o afección relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO en un sujeto se mitiga, alivia o cura después de administrar una dosis terapéutica de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, la célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o la composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención.

[0046] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar la trombocitopenia en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención. En el método de la presente invención, la trombocitopenia en el sujeto puede caracterizarse por una concentración de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$, inferior a $50 \times 10^9/l$ o inferior a $20 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre. En un método de la presente invención, la trombocitopenia puede estar relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO, la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. La trombocitopenia descrita en la presente puede estar causada por diversos factores, como la mielo-trombocitopenia, el aumento de la destrucción de plaquetas periféricas y el secuestro por esplenomegalia, como la radioterapia para tratar un tumor, la quimioterapia para tratar un tumor, el trasplante de médula ósea, la enfermedad hepática crónica, la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica y la trombocitopenia hereditaria. En una modalidad, el método de la presente invención para tratar la

trombocitopenia comprende administrar la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o una composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención y/o la mencionada molécula de ácido nucleico activador pequeño, el ácido nucleico que codifica la mencionada molécula de ácido nucleico activador pequeño, la célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o una composición que consiste en la composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención y otra formulación u otras formulaciones en una dosis terapéutica al sujeto, en la que la otra formulación comprende, por ejemplo, un compuesto de bajo peso molecular, un anticuerpo, un polipéptido y una proteína. El sujeto puede ser un mamífero, como un ratón o un ser humano. En el método mencionado anteriormente, la trombocitopenia puede comprender la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. En el método mencionado anteriormente, el sujeto comprende un mamífero, como un ratón o un ser humano. En una modalidad, la trombocitopenia en un sujeto se mitiga, alivia o cura después de administrar una dosis terapéutica de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, la célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención. Preferiblemente, la mitigación, el alivio o la curación pueden consistir en un aumento o una recuperación de la concentración de plaquetas hasta niveles fisiológicos cercanos a los normales, como por ejemplo en el rango de $100 \times 10^9/l$ a $300 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre.

[0047] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en la preparación de un fármaco para tratar una enfermedad o afección relacionada con la trombocitopenia y/o la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. El sujeto puede ser un mamífero, como un ser

humano. En los usos de la presente invención, la trombocitopenia está causada por diversos factores, que incluyen, entre otros, la mielo-trombocitopenia, el aumento de la destrucción de plaquetas periféricas y el secuestro esplénico. Los factores que provocan una reducción de las plaquetas comprenden la trombocitopenia congénita (hereditaria) y la trombocitopenia adquirida. En una modalidad, la trombocitopenia causada por factores adquiridos incluye, entre otros, la trombocitopenia causada por la anemia aplásica, los síndromes mielodisplásicos, la leucemia, los fármacos, las infecciones, las enfermedades tumorales, la radioterapia, el trasplante de médula ósea, las enfermedades hepáticas crónicas y la trombocitopenia inmunitaria (PTI). Los factores que provocan un aumento de la destrucción de las plaquetas son, entre otros, la trombocitopenia trombótica, la trombocitopenia inducida por heparina, la trombocitopenia inducida por fármacos, la PTI y la púrpura trombocitopénica trombótica. En una modalidad, la trombocitopenia puede comprender, por ejemplo, la trombocitopenia relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. Preferiblemente, la trombocitopenia puede comprender o seleccionarse de entre la trombocitopenia relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO, la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. La trombocitopenia aquí descrita puede estar causada por diversos factores, como la radioterapia para tratar un tumor, la quimioterapia para tratar un tumor, el trasplante de médula ósea, la enfermedad hepática crónica, el secuestro por esplenomegalia, la transfusión de sangre de banco con bajo contenido de plaquetas y el aumento del consumo de plaquetas debido a fármacos. En una modalidad, la trombocitopenia puede manifestarse como una concentración de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$, inferior a $50 \times 10^9/l$ o inferior a $20 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre.

[0048] En una modalidad, se proporciona un uso de una molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en la preparación de un fármaco para tratar la trombocitopenia o una enfermedad relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO. En una modalidad, la trombocitopenia puede comprender la trombocitopenia relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO, y preferiblemente, la trombocitopenia puede comprender la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. En una modalidad, la trombocitopenia puede manifestarse como una concentración de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$,

inferior a $50 \times 10^9/l$ o inferior a $20 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre.

[0049] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, la célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición o formulación que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en la preparación de un fármaco o composición farmacéutica para tratar la trombocitopenia. Preferiblemente, la trombocitopenia puede comprender o seleccionarse de entre la trombocitopenia relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO o la trombocitopenia debida a otras causas diversas, como la trombocitopenia inducida por fármacos, la trombocitopenia inmunitaria, la púrpura trombocitopénica trombótica, entre otras. La trombocitopenia en la presente puede estar causada por diversos factores, como la radioterapia para tratar un tumor, la quimioterapia para tratar un tumor, el trasplante de médula ósea, la enfermedad hepática crónica, el secuestro por esplenomegalia, la transfusión de sangre de banco con bajo contenido de plaquetas y el aumento del consumo de plaquetas debido a fármacos. En una modalidad, la trombocitopenia puede manifestarse como una concentración de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$, inferior a $50 \times 10^9/l$ o inferior a $20 \times 10^9/l$, según lo indicado por el recuento directo de plaquetas en sangre.

[0050] En una modalidad, un uso de una molécula de ácido nucleico activador pequeño descrita en la presente invención, un ácido nucleico que codifica la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, una célula que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención o el ácido nucleico que codifica para la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención, o la composición o formulación que comprende la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención en la preparación de un fármaco o composición farmacéutica para tratar la trombocitopenia o una enfermedad relacionada con la expresión insuficiente o disminuida de la proteína THPO.

[0051] **Ventajas de la presente invención**

[0052] La molécula de ácido nucleico activador pequeño, como el ARN activador pequeño (ARNap), es capaz de activar/regular al alza la expresión endógena del gen *Thpo/THPO* proporcionado por la presente invención y puede activar específicamente el gen *Thpo/THPO*, regulando al alza o restaurando la expresión del gen y la proteína *Thpo/THPO* con menores efectos tóxicos y secundarios, que puede utilizarse para tratar la trombocitopenia causada por una producción

insuficiente de plaquetas o una destrucción excesiva debido a una expresión insuficiente de la proteína *Thpo*/*THPO* y a diversas causas, o en la preparación de un fármaco o formulación para tratar la trombocitopenia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

[0053] **La FIGURA 1 muestra los cambios en la expresión del ARNm de *Thpo* de ratón mediados por el ARNap de *Thpo* de ratón.** Las células BNL.CL2 se transfectaron con 322 ARNap dirigidos al promotor del gen *Thpo* de ratón en una concentración final de 10 nM, y la expresión del ARNm de *Thpo* se analizó 72 h después de la transfección mediante RT-qPCR de un paso. La figura muestra el orden descendente de los cambios de expresión del ARNm ($\log_2$) de *Thpo* en relación con el tratamiento control (simulación). Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0054] **La FIGURA 2 muestra la región de punto caliente del ARNap de *Thpo* de ratón en el promotor de *Thpo* de ratón.** Las células BNL.CL2 se transfectaron con 322 ARNap dirigidos al promotor de *Thpo* de ratón en una concentración final de 10 nM durante 72 h, y la expresión del ARNm de *Thpo* se analizó después de la transfección mediante RT-qPCR de un paso. La figura muestra los cambios en la expresión de *Thpo* en relación con el tratamiento control (simulación) clasificados de -500 a -0, según las posiciones diana del ARNap en el promotor de *Thpo*. Los puntos negros lisos representan ARNap funcionales, los puntos con centro blanco representan ARNap no funcionales y las líneas punteadas enmarcan las regiones de punto caliente donde se reúnen 3 ARNap funcionales (H1 a H3). Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos.

[0055] **La FIGURA 3 muestra los resultados del HTS (*cribado de alto rendimiento*) del ARNap de *Thpo* de ratón validado por la RT-qPCR de dos pasos.** Como se muestra, las células BNL.CL2 se transfectaron con ARNap en una concentración final de 10 nM durante 72 h. Tras la transfección, se extrajo el ARN con el kit Qiagen RNeasy y se realizó la amplificación por qPCR con el sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 tras la transcripción inversa. Se amplificó el gen *Tbp* como control interno. Se muestran los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con un único ARNap. La simulación, dsCon2 y DS03-432i se muestran respectivamente como transfección testigo, transfección del ARN bicatenario independiente de la secuencia y transfección del ARN de interferencia pequeño control. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0056] **La FIGURA 4 muestra los resultados del HTS del ARNap de *Thpo* de ratón validado por la RT-qPCR de dos pasos.** Como se muestra, las células LPC-H12 se transfectaron con ARNap en una concentración final de 10 nM durante 72 h. Tras la transfección, se extrajo el ARN con el kit Qiagen RNeasy y se realizó la amplificación por qPCR con el sistema de PCR rápida en tiempo real

ABI 7500 tras la transcripción inversa. Se amplificó el gen *Tbp* como control interno. Se muestran los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con un único ARNap. La simulación, dsCon2 y DS03-432i se muestran respectivamente como transfección testigo, transfección del ARN bicatenario independiente de la secuencia y transfección del ARN de interferencia pequeño control. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0057] **La FIGURA 5 muestra los resultados del HTS del ARNap de *Thpo* de ratón validado por la RT-qPCR de dos pasos en una célula primaria hepática de ratón.** Como se muestra, las células primarias hepáticas de ratón fueron transfectadas con ARNap en una concentración final de 10 nM durante 72 h. Tras la transfección, se extrajo el ARN con el kit Qiagen RNeasy después de la transfección y se realizó la amplificación por qPCR con el sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 tras la transcripción inversa. Se amplificó el gen *Tbp* como control interno. Se muestran los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con un único ARNap. La simulación, dsCon2 y DS03-432i se muestran respectivamente como transfección testigo, transfección del ARN bicatenario independiente de la secuencia y transfección de ARN de interferencia pequeño control. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0058] **La FIGURA 6 muestra que el ARNap de *Thpo* de ratón aumenta la concentración de *Thpo* en el suero de los ratones.** Quince ratones *Balb/c* machos fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos con 5 ratones en cada grupo y recibieron PBS, *Thpo*-ARNip formulado en LNP (DS03-432i, 5 mg/kg) y *Thpo*-ARNap formulado en LNP (DS03-0024, 5 mg/kg) por inyección en la vena de la cola. Se tomaron muestras de sangre después de 72 h y se separó el suero. Se utilizó un kit ELISA de *Thpo* de ratón para determinar los niveles de proteína *Thpo* en el suero de los ratones. El PBS es un control testigo y el DS03-432i es un control de ARN de interferencia pequeño. (** $p < 0,001$).

[0059] **La FIGURA 7 muestra que el ARNap de *Thpo* de ratón aumenta la concentración de *Thpo* en el suero de los ratones.** Treinta y dos ratones *Balb/c* machos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos con 8 ratones en cada grupo y recibieron PBS y DS03-0024 formulado en LNP (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg) por inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre y se aisló el suero 1 día antes de la administración y 2 días después de la misma. Se utilizó un kit ELISA de *Thpo* de ratón para determinar los niveles de proteína *Thpo* en el suero de los ratones (**** $p < 0,0001$).

[0060] **La FIGURA 8 muestra que el ARNap de *Thpo* de ratón aumenta el número de plaquetas en el ratón.** Treinta y dos ratones *Balb/c* machos fueron divididos aleatoriamente en 4

grupos con 8 ratones en cada grupo y recibieron PBS y DS03-0024 formulado en LNP (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg) por inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre 6 días después de la administración y las plaquetas se recogieron utilizando un kit de aislamiento de plaquetas periféricas de ratón, que utilizaba un anticuerpo CD41a-FITC marcado para facilitar el recuento utilizando un citómetro de flujo. (* $p < 0,05$).

[0061] **La FIGURA 9 muestra los cambios en el número de plaquetas del ratón causados por el ARNap de *Thpo* de ratón 9 días después de la administración.** Treinta y dos ratones *Balb/c* machos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos con 8 ratones en cada grupo y recibieron PBS y DS03-0024 formulado en LNP (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg) por inyección en la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre 17 días después de la administración y las plaquetas se recogieron utilizando un kit de aislamiento de plaquetas periféricas de ratón, que utilizaba un anticuerpo CD41a-FITC marcado para facilitar el recuento utilizando un citómetro de flujo. (* $p < 0,05$).

[0062] **La FIGURA 10 muestra los cambios en la expresión del ARNm de *THPO* humano mediada por el ARNap de *THPO* humano.** Las células HepG2 se transfectaron con los ARNap candidatos dirigidos al promotor de *THPO* humano en una concentración final de 25 nM. La expresión del ARNm de *THPO* humano se analizó 72 h después de la transfección mediante RT-qPCR de un paso. La figura muestra el orden descendente de los cambios de expresión del ARNm ($\log_2$) de *THPO* en relación con el tratamiento control (simulación). Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0063] **La FIGURA 11 muestra la región de punto caliente del ARNap de *THPO* humano en el promotor de *THPO* humano.** Las células HepG2 se transfectaron con los ARNap candidatos dirigidos al promotor de *THPO* humano en una concentración final de 25 nM durante 72 h. La expresión del ARNm de *THPO* humano se analizó después de la transfección mediante RT-qPCR de un paso. La figura muestra los cambios en la expresión de *THPO* en relación con el tratamiento control (simulación), clasificados según las posiciones diana del ARNap en el promotor de *THPO*. Los puntos negros lisos representan ARNap funcionales, los puntos con centro blanco representan ARNap no funcionales y las líneas punteadas enmarcan las regiones de punto caliente donde se reúnen ARNap funcionales. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0064] **La FIGURA 12 muestra los resultados del HTS del ARNap de *THPO* humano validado por RT-qPCR de dos pasos.** Las células HepG2 se transfectaron con ARNap a una concentración final de 25 nM durante 72 h. Tras la transfección, se extrajo el ARN con el kit Qiagen RNeasy. Tras la transcripción inversa, se realizó la amplificación por qPCR con el sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500. Los genes TBP y HPRT1 se amplificaron como controles internos. Se muestran los

valores de expresión relativa del ARNm de *THPO* después de tratar las células con un único ARNap. Se muestran la simulación, dsCon2 y *siTHPO* (DS3A-365i), que son transfección testigo, transfección de ARN bicatenario independiente de la secuencia y transfección de ARN de interferencia pequeño control, respectivamente. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

[0065] **La FIGURA 13 muestra el efecto del ARNap de *THPO* humano sobre la expresión de la proteína THPO humana mediante el método ELISA.** Las células HepG2 se transfectaron con ARNap a una concentración final de 25 nM durante 72 h. Tras la transfección, se tomó el medio de cultivo y se centrifugó el sobrenadante para eliminar los restos de células muertas. El nivel de proteína THPO secretada en el medio de cultivo se determinó mediante un kit ELISA (R & D Systems, DTP00B). Se muestran los valores de expresión de la proteína THPO después de tratar las células con un único ARNap. Se muestran la simulación, dsCon2 y *siTHPO* (DS3A-365i), que son transfección testigo, transfección de ARN bicatenario independiente de la secuencia y transfección de ARN de interferencia pequeño control, respectivamente. Los valores de las ordenadas representan la media de 2 tratamientos repetidos $\pm$ DE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0066] En la presente invención, los términos relacionados se definen como se indica a continuación.

[0067] El término "complementariedad", según se usa en la presente, se refiere a la capacidad de formar pares de bases entre dos cadenas oligonucleotídicas. Los pares de bases generalmente se forman a través de enlaces de hidrógeno entre nucleótidos en las cadenas oligonucleotídicas antiparalelas. Las bases de las cadenas oligonucleotídicas complementarias se pueden aparear según el modo de Watson-Crick (tal como A con T, A con U y C con G) o de cualquier otro modo que permita la formación de una estructura doble (tal como el apareamiento de bases de Hoogsteen o Hoogsteen inverso).

[0068] La complementariedad comprende la complementariedad completa y la complementariedad incompleta. "Complementariedad completa" o "100 % de complementariedad" significa que cada nucleótido de la primera cadena oligonucleotídica puede formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido en una posición correspondiente en la segunda cadena oligonucleotídica en la región bicatenaria de la molécula oligonucleotídica bicatenaria sin "malapareamientos". "Complementariedad incompleta" significa que no todas las unidades nucleotídicas de las dos cadenas se unen entre sí mediante enlaces de hidrógeno. Por ejemplo, para dos cadenas oligonucleotídicas cada una de 20 nucleótidos de longitud en la región bicatenaria, si solo se pueden formar dos pares de bases en esta región bicatenaria a través de enlaces de hidrógeno, las cadenas

oligonucleotídicas tienen una complementariedad del 10 %. En el mismo ejemplo, si se pueden formar 18 pares de bases en esta región bicatenaria a través de enlaces de hidrógeno, las cadenas oligonucleotídicas tienen una complementariedad del 90 %. La complementariedad sustancial se refiere a al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 % de complementariedad.

[0069] El término "oligonucleótido", según se usa en la presente, se refiere a polímeros de nucleótidos, e incluye, entre otros, a moléculas monocatenarias o bicatenarias de ADN, ARN o híbrido de ADN/ARN, cadenas oligonucleotídicas que contienen porciones desoxirribosilo y porciones ribosilo que alternan de manera regular e irregular, así como a marcos modificados y de origen natural o no natural para dichos oligonucleótidos. El oligonucleótido para activar la transcripción del gen diana descrito en la presente es una molécula de ácido nucleico activador pequeño.

[0070] Los términos "cadena oligonucleotídica" y "secuencia oligonucleotídica", según se usan en la presente, se pueden usar de manera intercambiable, en referencia a un término genérico para secuencias de nucleótidos cortas que tienen menos de 35 bases (incluidos nucleótidos del ácido desoxirribonucleico [ADN] o ácido ribonucleico [ARN]). En la presente invención, una cadena oligonucleotídica puede tener una longitud cualquiera de 16 a 35 nucleótidos.

[0071] Según se utiliza en la presente, el término "primera cadena de ácido nucleico" puede ser una cadena sentido o una cadena antisentido. La cadena sentido de un ARN activador pequeño se refiere a una cadena de ácido nucleico contenida en una estructura doble de ARN activador pequeño que tiene identidad con respecto a la cadena codificante de la secuencia de ADN promotora de un gen diana, y la cadena antisentido se refiere a una cadena de ácido nucleico en la estructura doble del ARN activador pequeño que es complementaria a la cadena sentido.

[0072] Según se utiliza en la presente, el término "segunda cadena de ácido nucleico" también puede ser una cadena sentido o una cadena antisentido. Si la primera cadena oligonucleotídica es una cadena sentido, la segunda cadena oligonucleotídica es una cadena antisentido; si la primera cadena oligonucleotídica es una cadena antisentido, la segunda cadena oligonucleotídica es una cadena sentido.

[0073] El término "gen", según se usa en la presente, se refiere a todas las secuencias de nucleótidos necesarias para codificar una cadena polipeptídica o para transcribir un ARN funcional. "Gen" puede ser un gen endógeno o completa o parcialmente recombinante para una célula huésped (por ejemplo, debido a que se introducen un oligonucleótido exógeno y una secuencia codificante para codificar un promotor en una célula huésped, o se introduce un promotor heterogéneo adyacente a una secuencia

codificante endógena en una célula huésped). Por ejemplo, el término "gen" comprende una secuencia de ácido nucleico que consiste en exones e intrones. Las secuencias codificantes de proteínas son, por ejemplo, secuencias contenidas dentro de exones en un marco de lectura abierto entre un codón de iniciación y un codón de terminación y, según se usa en la presente, "gen" puede comprender una secuencia reguladora de gen, tal como un promotor, un potenciador, y todas las demás secuencias conocidas en la técnica para controlar la transcripción, la expresión o la actividad de otro gen, sin importar si el gen comprende una secuencia codificante o una secuencia no codificante. En un caso, por ejemplo, "gen" se puede usar para describir un ácido nucleico funcional que comprende una secuencia reguladora, tal como un promotor o un potenciador. La expresión de un gen recombinante se puede controlar mediante uno o más tipos de secuencias reguladoras heterogéneas.

[0074] El término "gen diana", según se usa en la presente, puede hacer referencia a secuencias de ácido nucleico naturalmente que están presentes en organismos, transgenes, secuencias víricas o bacterianas, cromosomas o genes extracromosómicos y/o que pueden transfectarse o incorporarse transitoria o establemente en células y/o en la cromatina de estas. El gen diana puede ser un gen codificante de una proteína o un gen no codificante de una proteína (tal como un gen de microARN y un gen de ARN no codificante largo). El gen diana generalmente contiene una secuencia promotora, y la regulación positiva del gen diana se puede lograr mediante el diseño de una molécula de ácido nucleico activador pequeño que tiene identidad de secuencia (también denominada homología) con respecto a la secuencia promotora, caracterizada como el aumento de la expresión del gen diana. "Secuencia de un promotor de gen diana" se refiere a una secuencia no codificante del gen diana, y la referencia a la secuencia de un promotor de gen diana en la frase "complementaria a la secuencia de un promotor de gen diana" de la presente invención se refiere a una cadena codificante de la secuencia, también conocida como la cadena que no es plantilla, es decir, una secuencia de ácido nucleico que tiene la misma secuencia que la secuencia codificante del gen. "Diana" o "secuencia diana" se refiere a un fragmento de secuencia en la secuencia de un promotor de gen diana que es homólogo o complementario a una cadena oligonucleotídica sentido o una cadena oligonucleotídica antisentido de una molécula de ácido nucleico activador pequeño.

[0075] Según se usan en la presente, los términos "cadena sentido" y "cadena de ácido nucleico sentido" se pueden usar de manera intercambiable, y la cadena oligonucleotídica sentido de una molécula de ácido nucleico activador pequeño se refiere a la primera cadena de ácido nucleico que presenta identidad de secuencia con la cadena codificante de la secuencia de un promotor de un gen diana en la estructura doble de la molécula de ácido nucleico activador pequeño.

[0076] Según se usan en la presente, los términos "cadena antisentido" y "cadena de ácido nucleico antisentido" se pueden usar de manera intercambiable, y la cadena oligonucleotídica antisentido de

una molécula de ácido nucleico activador pequeño se refiere a la segunda cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena oligonucleotídica sentido en la estructura doble de la molécula de ácido nucleico activador pequeño.

[0077] El término "cadena codificante", según se usa en la presente, se refiere a una cadena de ADN en el gen diana que no se puede usar para la transcripción, y la secuencia de nucleótidos de esta cadena es la misma que la de un ARN producido a partir de la transcripción (en el ARN, la T en el ADN se reemplaza por U). La cadena codificante de la secuencia de ADN bicatenaria del promotor de gen diana descrita en la presente se refiere a una secuencia promotora en la misma cadena de ADN que la cadena codificante de ADN del gen diana.

[0078] El término "cadena plantilla", según se usa en la presente, se refiere a la otra cadena complementaria a la cadena codificante en el ADN bicatenario del gen diana, es decir, la cadena que, como una plantilla, se puede transcribir en ARN, y esta cadena es complementaria al ARN transcrito (A con U y G con C). En el proceso de transcripción, la ARN polimerasa se une a la cadena plantilla, se mueve en dirección 3'→5' de la cadena plantilla y cataliza la síntesis del ARN en dirección 5'→3'. La cadena plantilla de la secuencia de ADN bicatenaria del promotor de gen diana descrita en la presente se refiere a una secuencia promotora en la misma cadena de ADN que la cadena plantilla de ADN del gen diana.

[0079] El término "promotor", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia que desempeña un papel regulador de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico codificante de proteínas o ARN al asociarse con ellas espacialmente. Generalmente, un promotor de gen eucariota contiene 100 a 5000 pares de bases, aunque no se pretende que este intervalo de longitud limite el término "promotor" según se usa en la presente. Aunque la secuencia promotora está generalmente ubicada en el extremo terminal 5' de una secuencia codificante de proteína o codificante de ARN, la secuencia promotora también puede existir en las secuencias exónicas e intrónicas.

[0080] El término "sitio de inicio de la transcripción", según se usa en la presente, se refiere a un nucleótido que marca el inicio de la transcripción en la cadena plantilla de un gen. El sitio de inicio de la transcripción puede aparecer en la cadena plantilla de la región promotora. Un gen puede tener más de un sitio de inicio de la transcripción.

[0081] El término "identidad" u "homología", según se usa en la presente, significa que una cadena oligonucleotídica (cadena sentido o antisentido) de un ARN activador pequeño presenta similitud de secuencia con una cadena codificante o una cadena plantilla en una región de la secuencia promotora de un gen diana. Según se usa en la presente, la "identidad" u "homología" puede ser de al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o 100 %.

aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %.

[0082] El término "prolongación", según se usa en la presente, se refiere a nucleótidos con bases no apareadas en el extremo (5' o 3') de una cadena oligonucleotídica, que se forman mediante la extensión de una cadena más allá de la otra cadena en un oligonucleótido bicatenario. Una región monocatenaria que se extiende más allá del extremo 3' y/o el extremo 5' de una estructura doble se denomina prolongación.

[0083] Según se usan en la presente, los términos "activación génica", "activación de la expresión génica", "aumento génico" y "aumentar la expresión génica" se pueden usar de manera intercambiable, y significan un aumento en la transcripción, traducción, expresión o actividad de un determinado ácido nucleico, según se determina al medir nivel de transcripción, nivel de ARNm, nivel de proteína, actividad enzimática, estado de metilación, estado o configuración de la cromatina, nivel de traducción o actividad o estado en un sistema celular o biológico de un gen. Estas actividades o estados se pueden determinar directa o indirectamente. Además, "activación génica", "activación de la expresión génica", "aumento génico" o "aumentar la expresión génica" se refiere a un aumento en la actividad asociada a una secuencia de ácido nucleico, independientemente del mecanismo de dicha activación. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico tiene una función reguladora como secuencia reguladora, la secuencia de ácido nucleico se transcribe en ARN, y el ARN se traduce a una proteína y aumenta así la expresión de la proteína.

[0084] Según se usan en la presente, los términos "ARN activador pequeño", "ARNap" y "molécula de ácido nucleico activador pequeño" se pueden usar de manera intercambiable y hacen referencia a una molécula de ácido nucleico que puede aumentar la expresión del gen diana y puede estar compuesta por un primer fragmento de ácido nucleico (cadena antisentido, también denominada cadena oligonucleotídica antisentido) que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene identidad de secuencia u homología con respecto a la secuencia de ácido nucleico no codificante (por ejemplo, un promotor y un potenciador) de un gen diana y un segundo fragmento de ácido nucleico (cadena sentido, también denominada cadena oligonucleotídica sentido) que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria al primer fragmento de ácido nucleico, en donde el primer fragmento de ácido nucleico y el segundo fragmento de ácido nucleico forman una estructura doble. La molécula de ácido nucleico activador pequeño también puede estar compuesta por una molécula monocatenaria de ARN sintetizada o expresada por vector que puede formar una estructura en horquilla entre dos regiones complementarias dentro de la molécula, en donde la primera región comprende una secuencia de nucleótidos que tiene identidad de secuencia con respecto a la secuencia diana de un promotor de un gen, y la segunda región comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la primera región. La longitud de la región de estructura doble de la molécula de

ácido nucleico activador pequeño tiene típicamente aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 12 a aproximadamente 48, aproximadamente 14 a aproximadamente 46, aproximadamente 16 a aproximadamente 44, aproximadamente 18 a aproximadamente 42, aproximadamente 20 a aproximadamente 40, aproximadamente 22 a aproximadamente 38, aproximadamente 24 a aproximadamente 36, aproximadamente 26 a aproximadamente 34, y aproximadamente 28 a aproximadamente 32 pares de bases, y típicamente aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50 pares de bases. Además, los términos "ARNap", "ARN activador pequeño" y "molécula de ácido nucleico activador pequeño" también comprenden ácidos nucleicos distintos del ribonucleótido, que incluyen, entre otros, nucleótidos o análogos modificados.

[0085] Según se utiliza en la presente, el término "punto caliente" se refiere a la región promotora de un gen de por lo menos 30 pb de longitud. La concentración de las dianas de las moléculas de ácido nucleico activador pequeño funcionales aparece en estas regiones de punto caliente, en las que por lo menos el 30 % de las moléculas de ácido nucleico activador pequeño que se dirigen a estas regiones de punto caliente pueden inducir entre 1,1 y 2,89 veces la expresión del ARNm de un gen diana.

[0086] Según se usa en la presente, el término "síntesis" se refiere a un método para la síntesis de un oligonucleótido, que incluye cualquier método que permite la síntesis de ARN, tal como síntesis química, transcripción *in vitro* y/o expresión basada en vector.

[0087] Según la presente invención, la expresión del gen *Thpo/THPO* se regula al alza mediante la activación del ARN, y una enfermedad relacionada (en particular, la trombocitopenia) se trata aumentando la expresión de la proteína THPO. El gen *Thpo/THPO*, en la presente invención, a veces se denomina también gen diana.

[0088] El método para preparar la molécula de ácido nucleico activador pequeño proporcionada en la presente invención comprende el diseño y la síntesis de secuencias.

[0089] La síntesis de la secuencia de la molécula de ácido nucleico activador pequeño de la presente invención puede realizarse adoptando una síntesis química o puede confiarse a una empresa de biotecnología especializada en la síntesis de ácidos nucleicos.

[0090] En términos generales, la síntesis química comprende las cuatro etapas siguientes (1) síntesis de ribonucleótidos oligoméricos, (2) desprotección, (3) purificación y aislamiento, y (4) desalación y apareamiento.

[0091] Por ejemplo, las etapas específicas para sintetizar químicamente los ARNap descritos en la presente son las siguientes:

[0092] (1) **Síntesis de ribonucleótidos oligoméricos**

[0093] Se configuró la síntesis de 1 μ M de ARN en un sintetizador de ADN/ARN automático (p. ej., Applied Biosystems EXPEDITE8909) y el tiempo de acoplamiento de cada ciclo también se configuró en 10 a 15 minutos. Con un sustrato de 5'-O-p-dimetoxitriifenilmetil-timidina en fase sólida como iniciador, se unió una base al sustrato en fase sólida en el primer ciclo y, luego, en el ciclo n ($19 \geq n \geq 2$), se unió una base a la base unida en el ciclo $n-1$. Este proceso se repitió hasta que se completó la síntesis de la secuencia de ácido nucleico completa.

[0094] (2) **Desprotección**

[0095] El sustrato de fase sólida unido al ARNap se colocó en un tubo de ensayo y se agregó 1 ml de una solución de la mezcla de etanol e hidróxido de amonio (relación volumétrica: 1:3) al tubo de ensayo. A continuación, se selló el tubo de ensayo y se colocó en una incubadora, y la mezcla se incubó a 25-70 °C de 2 a 30 h. La solución que contenía el sustrato de fase sólida unido al ARNap se filtró, y se recogió el filtrado. El sustrato de fase sólida se enjuagó dos veces con agua doblemente destilada (1 ml cada vez) y se recogió el filtrado. El eluyente recogido se combinó y se secó al vacío de 1 a 12 h. A continuación, se añadió 1 ml de una solución de fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano (1 M), se dejó reposar a temperatura ambiente de 4 a 12 h y se añadieron 2 ml de *n*-butanol. Se recogió el precipitado para proporcionar un producto bruto monocatenario de ARNap mediante centrifugación a alta velocidad.

[0096] (3) **Purificación y aislamiento**

[0097] El producto bruto de ARNap resultante se disolvió en 2 ml de solución de acetato de trietilamina en una concentración de 1 mol/l, y la solución se separó mediante una columna C18 de fase inversa para cromatografía de líquidos a alto rendimiento para proporcionar un producto monocatenario del ARNap purificado.

[0098] (4) **Desalación y apareamiento**

[0099] Las sales se retiraron mediante filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaño). Se mezclaron una cadena oligomérica simple de ácido ribonucleico sentido y una cadena oligomérica simple de ácido ribonucleico antisentido en 1 a 2 ml de amortiguador (Tris 10 mM, pH = 7,5-8,0, NaCl 50 mM) en una relación molar de 1:1. La solución se calentó hasta 95 °C y después lentamente se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente para proporcionar una solución que contenía ARNap.

[0100] En este estudio se descubrió que después de su introducción en una célula, el ARNap mencionado anteriormente podía aumentar eficazmente el ARNm de *Thpo/THPO* y la expresión de la proteína THPO.

[0101] La presente invención se ilustrará además en referencia a ejemplos específicos y gráficos incluidos más abajo. Se entenderá que mediante estos ejemplos se pretende ilustrar meramente la presente invención, en lugar de limitar el alcance de la presente invención. En los siguientes ejemplos, los métodos de estudio sin condiciones específicas siguieron de forma general las condiciones convencionales, como las descritas en Sambrook, et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o las condiciones recomendadas por el fabricante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Diseño y síntesis de ARNap dirigido al promotor del gen *Thpo* de ratón

[0102] Para seleccionar ARNap funcionales capaces de activar la expresión del gen *Thpo*, se utilizó como plantilla una secuencia promotora de *Thpo* con una longitud de 500 pb y se seleccionó una diana con una longitud de 19 pb a partir de -500 pb secuencia arriba del TSS. Las secuencias diana se filtraron y los criterios para retener las secuencias diana fueron (1) contenido de GC entre el 35 % y el 65 %, (2) con menos de 5 nucleótidos idénticos continuos, (3) con 3 o menos secuencias de repetición de dinucleótidos, y (4) con 3 o menos secuencias de repetición de trinucleótidos. Tras el filtrado, quedaron 322 secuencias diana que entraron en el proceso de selección como candidatas. A partir de estas secuencias candidatas, se sintetizaron químicamente los correspondientes ARNap bicatenarios.

[0103] Cada cadena sentido y antisentido del ARNap bicatenario utilizado en el estudio presentaba 21 nucleótidos de longitud. Los 19 nucleótidos en la región 5' de la primera cadena de ácido ribonucleico (cadena sentido) del ARNap bicatenario presentaban un 100 % de identidad con respecto a la secuencia diana del promotor, y el extremo terminal 3' de la primera cadena de ácido ribonucleico contenía una secuencia TT. Los 19 nucleótidos en la región 5' de la segunda cadena de ácido ribonucleico eran complementarios a la secuencia de la primera cadena de ácido ribonucleico y el extremo 3' de la segunda cadena de ácido ribonucleico contenía una secuencia TT. Las dos cadenas mencionadas del ARNap bicatenario se mezclaron en una relación molar de 1:1 y, tras el apareamiento, se formó un ARNap bicatenario.

[0104] La secuencia de la región promotora de *Thpo* de ratón se muestra como sigue, que corresponde desde la posición 1 a la posición 500 de 5' a 3' de la ID. SEC. N.º: 1 del listado de secuencias:

```
-500 taatataggc aatactact ttgccagttg gaaaggggaa atgccaggaa
-450 agacactcct ctggagcagg ggaatataga aggaaaagca agcaagccag
-400 catgctgtca gaattcagca gcaggtatac tgttcaggga aaagaaattt
-350 ggagagccag gaactgagac ttcattcatc taaaacaaga cctctctttc
-300 ccagagagaa ccgtattctg ccagatttct cctggactaa ccctcttctc
```

-250 tctctcactt aggtcccagg ttctcatgtc gccaggacat gagacagttc
 -200 ccgctataca aattctctct agagtgtgtg tgggtggagg agctgggctc
 -150 tattcatgga ccatgggtcca gccatgggct ctagtcccag tagacaggaa
 -100 aagaagtcgt catttccggg ggagccttca cctgggcttg gtggctctct
 -50 gctctctgat tgggcggaag tggcctgggc aggcctgtga ccctactac

Ejemplo 2: Cribado de alto rendimiento de ARN_{ap} dirigidos al promotor del gen *Thpo* de ratón

[0105] **Cultivo celular y transfección**

[0106] Las células hepáticas embrionarias de ratón (BNL.CL2) (Shanghai Institutes for Biological Sciences, GNM22) se cultivaron en un medio DMEM (Gibco), con un 10 % de suero bovino (Sigma-Aldrich) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células BNL.CL2 se introdujeron en placas de 96 pocillos con 3500 células/pocillo. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar ARN activadores pequeños a concentraciones de 10 nM (a menos que se especifique lo contrario) y la duración de la transfección fue de 72 h con 2 pocillos replicados para cada tratamiento.

[0107] (2) **RT-qPCR de un paso**

[0108] Los medios se desecharon después de la transfección y cada pocillo se lavó una vez con 150 µl de PBS. Tras eliminar el PBS, se añadieron 50 µl de amortiguador de lisis celular a cada pocillo y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. De cada pocillo, 1 µl de amortiguador de lisis celular se sometió a un análisis por qPCR en un sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) utilizando un kit TB GreenTM PrimeScriptTM RT-PCR II de un paso (Takara, RR086A) y cada muestra se amplificó en 3 pocillos replicados. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de reacción PCR

Reactivo	Volumen
2 × amortiguador de RT-PCR de un paso TB Green 4	2,5 µl
Mezcla de enzima de un paso PrimeScript 2	0,2 µl
Mezcla de cebadores directo e inverso (5 µM)	0,4 µl
dH ₂ O sin RNasa	1,4 µl
Lisado bruto (ARN)	0,5 µl
Suma	5 µl

[0109] Las condiciones de la reacción son las siguientes: fase 1: reacción de transcripción inversa: 5 min a 42 °C, 10 s a 95 °C; fase 2: reacción de PCR: 5 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 45 ciclos de amplificación. Se usaron *Sdha* y *Tbp* como genes de control interno. Los cebadores PCR utilizados

por *Thpo*, *Sdha* y *Tbp* se muestran en la Tabla 2 y *Thpo* se amplificó utilizando el par de cebadores *Thpo* F1/R1.

Tabla 2. Secuencias de cebadores para el análisis por RT-qPCR

Cebador	N.º de secuencia	Secuencia (5'-3')
<i>Thpo</i> F1	ID. SEC. N.º: 297	TGGAGCTGACTGATTTGCTCCTG
<i>Thpo</i> R1	ID. SEC. N.º: 298	AACAGGGATAGACAAAGGGTCG
<i>Sdha</i> F	ID SEC N.º: 299	ATGGTCACTAGGGCTGGTTTG
<i>Sdha</i> R	ID SEC N.º: 300	ACGACACCCTTCTGTGATGAG
<i>Tbp</i> F	ID SEC N.º: 301	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACT
<i>Tbp</i> R	ID SEC N.º: 302	TGTCCGTGGCTCTCTTATTC

[0110] Para calcular el nivel de expresión (E_{rel}) de un gen *Thpo* (diana) en una muestra transfectada con ARNap con respecto al tratamiento control (simulación), se insertaron los valores Ct del gen diana y los dos genes de control interno en la fórmula 1.

$$E_{rel} = 2^{(CtT_m - CtT_s)} / ((2^{(CtR1_m - CtR1_s)} * 2^{(CtR2_m - CtR2_s)})^{(1/2)})$$

Fórmula 1

[0111] en la que CtT_m es el valor Ct del gen diana de la muestra del tratamiento control (simulación); CtT_s es el valor Ct del gen diana de la muestra tratada con ARNap. $CtR1_m$ es el valor Ct del gen de control interno 1 de la muestra tratada con la simulación; $CtR1_s$ es el valor Ct del gen de control interno 1 de la muestra tratada con ARNap; $CtR2_m$ es el valor Ct del gen de control interno 2 de la muestra de tratamiento control; y $CtR2_s$ es el valor Ct del gen de control interno 2 de la muestra tratada con ARNap.

[0112] (3) Cribado de ARNap funcionales de ratón

[0113] Para obtener los ARNap capaces de activar la transcripción de *Thpo*, se transfectaron las células BNL.CL2 con los 322 ARNap mencionados anteriormente en una concentración de 10 nM. Según los métodos descritos en la presente, las células se lisaron 72 h después y se sometieron a un análisis por RT-qPCR de un paso para obtener el valor de expresión relativa del gen *Thpo* para cada muestra tratada con ARNap en comparación con el tratamiento control. Según se muestra en la Tabla 3, 18 (5,6 %) ARNap mostraron una alta activación, 79 (24,5 %) ARNap mostraron una activación leve y 142 (69,9 %) ARNap no afectaron a la expresión de *Thpo*. La activación máxima fue de 2,89 veces y la inhibición máxima fue de 0,26 veces. Los ARNap con actividad de activación se denominan ARNap funcionales o activadores.

Tabla 3. Resultados del cribado de alto rendimiento de ARNap de *Thpo* de ratón

Actividad de ARNap	Valor log ₂ (múltiplo) de los cambios en el ARNm de <i>Thpo</i>	Cantidad de ARNap	Porcentaje
Activación alta	$\geq 0,58$ (1,50) $\sim \leq 1,53$ (2,89)	18	5,6 %
Activación leve	$\geq 0,13$ (1,10) $\sim < 0,58$ (1,50)	79	24,5 %
Sin efecto activador	$< 0,13$ (1,10)	225	69,9 %
Suma		322	100 %

[0114] En la **FIGURA 1** se muestran los cambios en la expresión de *Thpo* del ARNap de *Thpo* de ratón en orden descendente. Las secuencias de ARNap funcionales de *Thpo*, sus secuencias diana y el múltiplo de cambios en la expresión relativa del ARNm de *Thpo* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de ARNap funcionales de ratón, sus secuencias diana y cambios en la expresión del ARNm de *Thpo* de ratón

ARNap	Secuencia diana (5'-3')	Secuencia sentido (5'-3') de ARNap	Secuencia antisentido (5'-3') de ARNap	Múltiplo de cambios en la expresión relativa del ARNm de <i>Thpo</i>
RAG3-493	GGCAATACCTACTTTGCCA (ID SEC N.º: 200)	GGCAAUACCUACUUUGCCATT (ID SEC N.º: 6)	UGGCAAAGUAGGUAUUGCCTT (ID SEC N.º: 103)	1,17
RAG3-490	AATACCTACTTTGCCAGTT (ID SEC N.º: 201)	AAUACCUACUUUGCCAGUUTT (ID SEC N.º: 7)	AACUGGCAAAGUAGGUAUUTT (ID SEC N.º: 104)	1,21
RAG3-486	CCTACTTTGCCAGTTGGAA (ID SEC N.º: 202)	CCUACUUUGCCAGUUGGAATT (ID SEC N.º: 8)	UUCCAACUGGCAAAGUAGGTT (ID SEC N.º: 105)	1,76
RAG3-484	TACTTTGCCAGTTGGAAAG (ID SEC N.º: 203)	UACUUUGCCAGUUGGAAAGTT (ID SEC N.º: 9)	CUUUCCAACUGGCAAAGUATT (ID SEC N.º: 106)	1,13
RAG3-483	ACTTTGCCAGTTGGAAAGG (ID SEC N.º: 204)	ACUUUGCCAGUUGGAAAGGTT (ID SEC N.º: 10)	CCUUCCAACUGGCAAAGUTT (ID SEC N.º: 107)	1,24
RAG3-479	TGCCAGTTGGAAAGGGGAA (ID SEC N.º: 205)	UGCCAGUUGGAAAGGGGAATT (ID SEC N.º: 11)	UUCCCCUUCCAACUGGCATT (ID SEC N.º: 108)	1,25
RAG3-474	GTTGGAAAGGGGAAATGCC (ID SEC N.º: 206)	GUUGGAAAGGGGAAAUGCCTT (ID SEC N.º: 12)	GGCAUUUCCCCUUUCCAATT (ID SEC N.º: 109)	1,22
RAG3-472	TGGAAAGGGGAAATGCCAG (ID SEC N.º: 207)	UGGAAAGGGGAAAUGCCAGTT (ID SEC N.º: 13)	CUGGCAUUUCCCCUUUCCATT (ID SEC N.º: 110)	1,41
RAG3-471	GGAAAGGGGAAATGCCAGG (ID SEC N.º: 208)	GGAAAGGGGAAAUGCCAGGTT (ID SEC N.º: 14)	CCUGGCAUUUCCCCUUUCCTT (ID SEC N.º: 111)	1,81
RAG3-466	GGGGAAATGCCAGGAAAGA (ID SEC N.º: 209)	GGGGAAAUGCCAGGAAAGATT (ID SEC N.º: 15)	UCUUUCCUGGCAUUUCCCCTT (ID SEC N.º: 112)	1,64

RAG3-465	GGGAAATGCCAGGAAAGAC (ID SEC N.º: 210)	GGGAAAUGCCAGGAAAGACTT (ID SEC N.º: 16)	GUCUUUCCUGGCAUUUCCCTT (ID SEC N.º: 113)	1,29
RAG3-461	AATGCCAGGAAAGACACTC (ID SEC N.º: 211)	AAUGCCAGGAAAGACACUCTT (ID SEC N.º: 17)	GAGUGUCUUUCCUGGCAUUTT (ID SEC N.º: 114)	1,48
RAG3-460	ATGCCAGGAAAGACACTCC (ID SEC N.º: 212)	AUGCCAGGAAAGACACUCCTT (ID SEC N.º: 18)	GGAGUGUCUUUCCUGGCAUTT (ID SEC N.º: 115)	1,14
RAG3-459	TGCCAGGAAAGACACTCCT (ID SEC N.º: 213)	UGCCAGGAAAGACACUCCUTT (ID SEC N.º: 19)	AGGAGUGUCUUUCCUGGCATT (ID SEC N.º: 116)	1,10
RAG3-454	GGAAAGACACTCCTCTGGA (ID SEC N.º: 214)	GGAAAGACACUCCUCUGGATT (ID SEC N.º: 20)	UCCAGAGGAGUGUCUUUCCTT (ID SEC N.º: 117)	1,24
RAG3-453	GAAAGACACTCCTCTGGAG (ID SEC N.º: 215)	GAAAGACACUCCUCUGGAGTT (ID SEC N.º: 21)	CUCCAGAGGAGUGUCUUUCTT (ID SEC N.º: 118)	1,49
RAG3-450	AGACACTCCTCTGGAGCAG (ID SEC N.º: 216)	AGACACUCCUCUGGAGCAGTT (ID SEC N.º: 22)	CUGCUCAGAGGAGUGUCUTT (ID SEC N.º: 119)	1,24
RAG3-449	GACACTCCTCTGGAGCAGG (ID SEC N.º: 217)	GACACUCCUCUGGAGCAGGTT (ID SEC N.º: 23)	CCUGCUCAGAGGAGUGUCTT (ID SEC N.º: 120)	1,14
RAG3-448	ACACTCCTCTGGAGCAGGG (ID SEC N.º: 218)	ACACUCCUCUGGAGCAGGGTT (ID SEC N.º: 24)	CCCUGCUCAGAGGAGUGUTT (ID SEC N.º: 121)	1,54
RAG3-446	ACTCCTCTGGAGCAGGGGA (ID SEC N.º: 219)	ACUCCUCUGGAGCAGGGGATT (ID SEC N.º: 25)	UCCCCUGCUCAGAGGAGUTT (ID SEC N.º: 122)	1,36
RAG3-441	TCTGGAGCAGGGGAATATA (ID SEC N.º: 220)	UCUGGAGCAGGGGAUAUATT (ID SEC N.º: 26)	UAUAUUCCCCUGCUCCAGATT (ID SEC N.º: 123)	1,15
RAG3-440	CTGGAGCAGGGGAATATAG (ID SEC N.º: 221)	CUGGAGCAGGGGAUAUAGTT (ID SEC N.º: 27)	CUAUAUCCCCUGCUCCAGTT (ID SEC N.º: 124)	1,14
RAG3-439	TGGAGCAGGGGAATATAGA (ID SEC N.º: 222)	UGGAGCAGGGGAUAUAGATT (ID SEC N.º: 28)	UCUAUAUCCCCUGCUCCATT (ID SEC N.º: 125)	1,10
RAG3-437	GAGCAGGGGAATATAGAAG (ID SEC N.º: 223)	GAGCAGGGGAUAUAGAAGTT (ID SEC N.º: 29)	CUUCUAUAUCCCCUGCUCTT (ID SEC N.º: 126)	1,12

RAG3-436	AGCAGGGGAATATAGAAGG (ID SEC N.º: 224)	AGCAGGGGAUUAUAGAAGGTT (ID SEC N.º: 30)	CCUUCUAUUAUCCCCUGCUTT (ID SEC N.º: 127)	1,99
RAG3-435	GCAGGGGAATATAGAAGGA (ID SEC N.º: 225)	GCAGGGGAUUAUAGAAGGATT (ID SEC N.º: 31)	UCCUUCUAUUAUCCCCUGCTT (ID SEC N.º: 128)	1,83
RAG3-434	CAGGGGAATATAGAAGGAA (ID SEC N.º: 226)	CAGGGGAUUAUAGAAGGAATT (ID SEC N.º: 32)	UCCUUCUAUUAUCCCCUGTT (ID SEC N.º: 129)	1,47
RAG3-433	AGGGGAATATAGAAGGAAA (ID SEC N.º: 227)	AGGGGAUUAUAGAAGGAAATT (ID SEC N.º: 33)	UUUCCUUCUAUUAUCCCCUTT (ID SEC N.º: 130)	1,13
RAG3-432	GGGGAATATAGAAGGAAAA (ID SEC N.º: 228)	GGGGAUUAUAGAAGGAAAATT (ID SEC N.º: 34)	UUUCCUUCUAUUAUCCCCCTT (ID SEC N.º: 131)	1,10
RAG3-430	GGAATATAGAAGGAAAAGC (ID SEC N.º: 229)	GGAAUUAUAGAAGGAAAAGCTT (ID SEC N.º: 35)	GCUUUUCCUUCUAUUAUUCCTT (ID SEC N.º: 132)	1,20
RAG3-426	TATAGAAGGAAAAGCAAGC (ID SEC N.º: 230)	UAUAGAAGGAAAAGCAAGCTT (ID SEC N.º: 36)	GCUUGCUUUUCCUUCUAUATT (ID SEC N.º: 133)	1,18
RAG3-425	ATAGAAGGAAAAGCAAGCA (ID SEC N.º: 231)	AUAGAAGGAAAAGCAAGCATT (ID SEC N.º: 37)	UGCUUGCUUUUCCUUCUAUTT (ID SEC N.º: 134)	1,57
RAG3-424	TAGAAGGAAAAGCAAGCAA (ID SEC N.º: 232)	UAGAAGGAAAAGCAAGCAATT (ID SEC N.º: 38)	UUGCUUGCUUUUCCUUCUATT (ID SEC N.º: 135)	1,79
RAG3-421	AAGGAAAAGCAAGCAAGCC (ID SEC N.º: 233)	AAGGAAAAGCAAGCAAGCCTT (ID SEC N.º: 39)	GGCUUGCUUGCUUUUCCUUTT (ID SEC N.º: 136)	1,11
RAG3-420	AGGAAAAGCAAGCAAGCCA (ID SEC N.º: 234)	AGGAAAAGCAAGCAAGCCATT (ID SEC N.º: 40)	UGGCUUGCUUGCUUUUCCUTT (ID SEC N.º: 137)	1,25
RAG3-419	GGAAAAGCAAGCAAGCCAG (ID SEC N.º: 235)	GGAAAAGCAAGCAAGCCAGTT (ID SEC N.º: 41)	CUGGCUUGCUUGCUUUUCCTT (ID SEC N.º: 138)	1,51
RAG3-418	GAAAAGCAAGCAAGCCAGC (ID SEC N.º: 236)	GAAAAGCAAGCAAGCCAGCTT (ID SEC N.º: 42)	GCUGGCUUGCUUGCUUUUCTT (ID SEC N.º: 139)	1,12
RAG3-417	AAAAGCAAGCAAGCCAGCA (ID SEC N.º: 237)	AAAAGCAAGCAAGCCAGCATT (ID SEC N.º: 43)	UGCUGGCUUGCUUGCUUUUTT (ID SEC N.º: 140)	1,19

RAG3-414	AGCAAGCAAGCCAGCATGC (ID SEC N.º: 238)	AGCAAGCAAGCCAGCAUGCTT (ID SEC N.º: 44)	GCAUGCUGGCUUGCUUGCUTT (ID SEC N.º: 141)	1,27
RAG3-410	AGCAAGCCAGCATGCTGTC (ID SEC N.º: 239)	AGCAAGCCAGCAUGCUGUCTT (ID SEC N.º: 45)	GACAGCAUGCUGGCUUGCUTT (ID SEC N.º: 142)	1,39
RAG3-409	GCAAGCCAGCATGCTGTCA (ID SEC N.º: 240)	GCAAGCCAGCAUGCUGUCATT (ID SEC N.º: 46)	UGACAGCAUGCUGGCUUGCTT (ID SEC N.º: 143)	1,38
RAG3-408	CAAGCCAGCATGCTGTCAG (ID SEC N.º: 241)	CAAGCCAGCAUGCUGUCAGTT (ID SEC N.º: 47)	CUGACAGCAUGCUGGCUUGTT (ID SEC N.º: 144)	2,09
RAG3-405	GCCAGCATGCTGTCAGAAT (ID SEC N.º: 242)	GCCAGCAUGCUGUCAGAAUTT (ID SEC N.º: 48)	AUUCUGACAGCAUGCUGGCTT (ID SEC N.º: 145)	1,53
RAG3-404	CCAGCATGCTGTCAGAATT (ID SEC N.º: 243)	CCAGCAUGCUGUCAGAAUUTT (ID SEC N.º: 49)	AAUUCUGACAGCAUGCUGGTT (ID SEC N.º: 146)	1,18
RAG3-397	GCTGTCAGAAATTCAGCAGC (ID SEC N.º: 244)	GCUGUCAGAAUUCAGCAGCTT (ID SEC N.º: 50)	GCUGCUGAAUUCUGACAGCTT (ID SEC N.º: 147)	1,34
RAG3-396	CTGTCAGAAATTCAGCAGCA (ID SEC N.º: 245)	CUGUCAGAAUUCAGCAGCATT (ID SEC N.º: 51)	UGCUGCUGAAUUCUGACAGTT (ID SEC N.º: 148)	1,17
RAG3-378	AGGTATACTGTTTCAGGGAA (ID SEC N.º: 246)	AGGUUAUCUGUUCAGGGAATT (ID SEC N.º: 52)	UUCCCUGAACAGUAUACCUTT (ID SEC N.º: 149)	1,36
RAG3-377	GGTATACTGTTTCAGGGAAA (ID SEC N.º: 247)	GGUAUACUGUUCAGGGAAATT (ID SEC N.º: 53)	UUUCCCUGAACAGUAUACCTT (ID SEC N.º: 150)	1,32
RAG3-376	GTATACTGTTTCAGGGAAAA (ID SEC N.º: 248)	GUAUACUGUUCAGGGAAAATT (ID SEC N.º: 54)	UUUUCCCUGAACAGUAUACTT (ID SEC N.º: 151)	1,67
RAG3-375	TATACTGTTTCAGGGAAAAG (ID SEC N.º: 249)	UAUACUGUUCAGGGAAAAGTT (ID SEC N.º: 55)	CUUUUCCCUGAACAGUAUATT (ID SEC N.º: 152)	1,11
RAG3-360	AAAGAAATTTGGAGAGCCA (ID SEC N.º: 250)	AAAGAAAUUUGGAGAGCCATT (ID SEC N.º: 56)	UGGCUCUCCAAAUUUCUUUTT (ID SEC N.º: 153)	1,12
RAG3-337	CTGAGACTTCATCCATCTA (ID SEC N.º: 251)	CUGAGACUUCAUCCAUCUATT (ID SEC N.º: 57)	UAGAUGGAUGAAGUCUCAGTT (ID SEC N.º: 154)	1,15

RAG3-290	CCGTATTCTGCCAGATTTC (ID SEC N.º: 252)	CCGUAUUCUGCCAGAUUUCTT (ID SEC N.º: 58)	GAAAUCUGGCAGAAUACGGTT (ID SEC N.º: 155)	1,14
RAG3-273	TCTCCTGGACTAACCCTCT (ID SEC N.º: 253)	UCUCCUGGACUAACCCUCUTT (ID SEC N.º: 59)	AGAGGGUUAGUCCAGGAGATT (ID SEC N.º: 156)	2,89
RAG3-272	CTCCTGGACTAACCCTCTT (ID SEC N.º: 254)	CUCCUGGACUAACCCUCUUTT (ID SEC N.º: 60)	AAGAGGGUUAGUCCAGGAGTT (ID SEC N.º: 157)	1,89
RAG3-271	TCCTGGACTAACCCTCTTC (ID SEC N.º: 255)	UCCUGGACUAACCCUCUUCTT (ID SEC N.º: 61)	GAAGAGGGUUAGUCCAGGATT (ID SEC N.º: 158)	1,17
RAG3-244	ACTTAGGTCCCAGGTTCTC (ID SEC N.º: 256)	ACUUAGGUCCCAGGUUCUUTT (ID SEC N.º: 62)	GAGAACCUGGGACCUAAGUTT (ID SEC N.º: 159)	1,17
RAG3-243	CTTAGGTCCCAGGTTCTCA (ID SEC N.º: 257)	CUUAGGUCCCAGGUUCUCATT (ID SEC N.º: 63)	UGAGAACCUGGGACCUAAGTT (ID SEC N.º: 160)	1,45
RAG3-242	TTAGGTCCCAGGTTCTCAT (ID SEC N.º: 258)	UUAGGUCCCAGGUUCUCAUTT (ID SEC N.º: 64)	AUGAGAACCUGGGACCUAATT (ID SEC N.º: 161)	1,27
RAG3-239	GGTCCCAGGTTCTCATGTC (ID SEC N.º: 259)	GGUCCCAGGUUCUCAUGUCTT (ID SEC N.º: 65)	GACAUGAGAACCUGGGACCTT (ID SEC N.º: 162)	1,10
RAG3-229	TCTCATGTCGCCAGGACAT (ID SEC N.º: 260)	UCUCAUGUCGCCAGGACAUTT (ID SEC N.º: 66)	AUGUCCUGGCGACAUGAGATT (ID SEC N.º: 163)	1,12
RAG3-227	TCATGTCGCCAGGACATGA (ID SEC N.º: 261)	UCAUGUCGCCAGGACAUGATT (ID SEC N.º: 67)	UCAUGUCCUGGCGACAUGATT (ID SEC N.º: 164)	1,39
RAG3-226	CATGTCGCCAGGACATGAG (ID SEC N.º: 262)	CAUGUCGCCAGGACAUGAGTT (ID SEC N.º: 68)	CUCAUGUCCUGGCGACAUGTT (ID SEC N.º: 165)	1,30
RAG3-219	CCAGGACATGAGACAGTTC (ID SEC N.º: 263)	CCAGGACAUGAGACAGUUCTT (ID SEC N.º: 69)	GAACUGUCUCAUGUCCUGGTT (ID SEC N.º: 166)	1,24
RAG3-215	GACATGAGACAGTTCCCGC (ID SEC N.º: 264)	GACAUGAGACAGUUCCCGCTT (ID SEC N.º: 70)	GCGGGAACUGUCUCAUGUCTT (ID SEC N.º: 167)	1,32
RAG3-214	ACATGAGACAGTTCCCGCT (ID SEC N.º: 265)	ACAUGAGACAGUUCCCGCUTT (ID SEC N.º: 71)	AGCGGGAACUGUCUCAUGUTT (ID SEC N.º: 168)	1,28

RAG3-206	CAGTTCCCGCTATACAAAT (ID SEC N.º: 266)	CAGUCCCCGCUAUACAAAUTT (ID SEC N.º: 72)	AUUUGUAUAGCGGGAACUGTT (ID SEC N.º: 169)	1,31
RAG3-205	AGTTCCCGCTATACAAATT (ID SEC N.º: 267)	AGUUCCCCGCUAUACAAAUUTT (ID SEC N.º: 73)	AAUUUGUAUAGCGGGAACUTT (ID SEC N.º: 170)	1,14
RAG3-204	GTTCCCGCTATACAAATTC (ID SEC N.º: 268)	GUUCCCCGCUAUACAAAUUCTT (ID SEC N.º: 74)	GAAUUUGUAUAGCGGGAACCTT (ID SEC N.º: 171)	1,65
RAG3-203	TTCCCGCTATACAAATTCT (ID SEC N.º: 269)	UUCCCCGCUAUACAAAUUCUTT (ID SEC N.º: 75)	AGAAUUUGUAUAGCGGGAATT (ID SEC N.º: 172)	1,42
RAG3-202	TCCCGCTATACAAATTCTC (ID SEC N.º: 270)	UCCCGCUAUACAAAUUCUCTT (ID SEC N.º: 76)	GAGAAUUUGUAUAGCGGGATT (ID SEC N.º: 173)	1,31
RAG3-164	GAGGAGCTGGGCTCTATTC (ID SEC N.º: 271)	GAGGAGCUGGGCUCUAUUCTT (ID SEC N.º: 77)	GAAUAGAGCCCAGCUCCUCTT (ID SEC N.º: 174)	1,13
RAG3-158	CTGGGCTCTATTCATGGAC (ID SEC N.º: 272)	CUGGGCUCUAUUCAUGGACTT (ID SEC N.º: 78)	GUCCAUGAAUAGAGCCCAGTT (ID SEC N.º: 175)	1,17
RAG3-153	CTCTATTCATGGACCATGG (ID SEC N.º: 273)	CUCUAUUCAUGGACCAUGGTT (ID SEC N.º: 79)	CCAUGGUCCAUGAAUAGAGTT (ID SEC N.º: 176)	1,17
RAG3-152	TCTATTCATGGACCATGGT (ID SEC N.º: 274)	UCUAUUCAUGGACCAUGGUTT (ID SEC N.º: 80)	ACCAUGGUCCAUGAAUAGATT (ID SEC N.º: 177)	1,10
RAG3-151	CTATTCATGGACCATGGTC (ID SEC N.º: 275)	CUAUUCAUGGACCAUGGUCTT (ID SEC N.º: 81)	GACCAUGGUCCAUGAAUAGTT (ID SEC N.º: 178)	1,44
RAG3-150	TATTCATGGACCATGGTCC (ID SEC N.º: 276)	UAUUCAUGGACCAUGGUCCTT (ID SEC N.º: 82)	GGACCAUGGUCCAUGAAUATT (ID SEC N.º: 179)	1,24
RAG3-147	TCATGGACCATGGTCCAGC (ID SEC N.º: 277)	UCAUGGACCAUGGUCCAGCTT (ID SEC N.º: 83)	GCUGGACCAUGGUCCAUGATT (ID SEC N.º: 180)	1,31
RAG3-146	CATGGACCATGGTCCAGCC (ID SEC N.º: 278)	CAUGGACCAUGGUCCAGCCTT (ID SEC N.º: 84)	GGCUGGACCAUGGUCCAUGTT (ID SEC N.º: 181)	1,44
RAG3-142	GACCATGGTCCAGCCATGG (ID SEC N.º: 279)	GACCAUGGUCCAGCCAUGGTT (ID SEC N.º: 85)	CCAUGGCUGGACCAUGGUCTT (ID SEC N.º: 182)	1,26

RAG3-134	TCCAGCCATGGGCTCTAGT (ID SEC N.º: 280)	UCCAGCCAUGGGCUCUAGUTT (ID SEC N.º: 86)	ACUAGAGCCCAUGGCUGGATT (ID SEC N.º: 183)	1,41
RAG3-133	CCAGCCATGGGCTCTAGTC (ID SEC N.º: 281)	CCAGCCAUGGGCUCUAGUCTT (ID SEC N.º: 87)	GACUAGAGCCCAUGGCUGGTT (ID SEC N.º: 184)	1,11
RAG3-129	CCATGGGCTCTAGTCCCAG (ID SEC N.º: 282)	CCAUGGGCUCUAGUCCCAGTT (ID SEC N.º: 88)	CUGGGACUAGAGCCCAUGGTT (ID SEC N.º: 185)	1,30
RAG3-122	CTCTAGTCCCAGTAGACAG (ID SEC N.º: 283)	CUCUAGUCCCAGUAGACAGTT (ID SEC N.º: 89)	CUGUCUACUGGGACUAGAGTT (ID SEC N.º: 186)	1,51
RAG3-121	TCTAGTCCCAGTAGACAGG (ID SEC N.º: 284)	UCUAGUCCCAGUAGACAGGTT (ID SEC N.º: 90)	CCUGUCUACUGGGACUAGATT (ID SEC N.º: 187)	1,72
RAG3-111	GTAGACAGGAAAAGAAGTC (ID SEC N.º: 285)	GUAGACAGGAAAAGAAGUCTT (ID SEC N.º: 91)	GACUUCUUUUCUGUCUACTT (ID SEC N.º: 188)	1,26
RAG3-110	TAGACAGGAAAAGAAGTCG (ID SEC N.º: 286)	UAGACAGGAAAAGAAGUCGTT (ID SEC N.º: 92)	CGACUUCUUUUCUGUCUATT (ID SEC N.º: 189)	1,25
RAG3-101	AAAGAAGTCGTCATTTCCG (ID SEC N.º: 287)	AAAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (ID SEC N.º: 93)	CGGAAAUGACGACUUCUUUTT (ID SEC N.º: 190)	1,14
RAG3-100	AAGAAGTCGTCATTTCCGG (ID SEC N.º: 288)	AAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (ID SEC N.º: 94)	CCGGAAAUGACGACUUCUUTT (ID SEC N.º: 191)	1,15
RAG3-099	AGAAGTCGTCATTTCCGGG (ID SEC N.º: 289)	AGAAGUCGUCAUUUCCGGGTT (ID SEC N.º: 95)	CCCGGAAAUGACGACUUCUTT (ID SEC N.º: 192)	1,12
RAG3-078	AGCCTTCACCTGGGCTTGG (ID SEC N.º: 290)	AGCCUUCACCUGGGCUUGGTT (ID SEC N.º: 96)	CCAAGCCCAGGUGAAGGCUTT (ID SEC N.º: 193)	1,10
RAG3-071	ACCTGGGCTTGGTGGCTCT (ID SEC N.º: 291)	ACCUGGGCUUGGUGGCUCUTT (ID SEC N.º: 97)	AGAGCCACCAAGCCCAGGUTT (ID SEC N.º: 194)	1,10
RAG3-047	CTCTGATTGGGCGGAAGTG (ID SEC N.º: 292)	CUCUGAUUGGGCGGAAGUGTT (ID SEC N.º: 98)	CACUUCCGCCCAAUCAGAGTT (ID SEC N.º: 195)	1,66
RAG3-046	TCTGATTGGGCGGAAGTGG (ID SEC N.º: 293)	UCUGAUUGGGCGGAAGUGGTT (ID SEC N.º: 99)	CCACUUCCGCCCAAUCAGATT (ID SEC N.º: 196)	1,15

RAG3-044	TGATTGGGCGGAAGTGGCC (ID SEC N.º: 294)	UGAUUGGGCGGAAGUGGCCTT (ID SEC N.º: 100)	GGCCACUUCCGCCCAAUCATT (ID SEC N.º: 197)	1,20
RAG3-023	GGCAGGCTTGTGACCCTAC (ID SEC N.º: 295)	GGCAGGCUUGUGACCCUACTT (ID SEC N.º: 101)	GUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (ID SEC N.º: 198)	1,27
RAG3-022	GCAGGCTTGTGACCCTACT (ID SEC N.º: 296)	GCAGGCUUGUGACCCUACUTT (ID SEC N.º: 102)	AGUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (ID SEC N.º: 199)	1,11

[0115] Se puede apreciar claramente, a partir de la clasificación de las actividades de los 322 ARNap según sus posiciones en la región promotora de *Thpo*, que los ARNap funcionales están agrupados, es decir, en ciertas regiones promotoras, los ARNap activadores se agruparon en regiones de "punto caliente" específicas (**FIGURA 2**). Como se muestra en la **FIGURA 2**, aparecieron 3 regiones de punto caliente, respectivamente, en la región (H1) de -493 a -356, la región (H2) de -273 a -183 y la región (H3) de -164 a -80 del promotor, mostrando un alto grado de enriquecimiento de los ARNap activadores. Los resultados del análisis indican que los ARNap activadores no estaban distribuidos aleatoriamente en el promotor, sino que existían en las regiones de punto caliente específicas.

[0116] La secuencia de punto caliente H1 (5' a 3': -493 a -356) corresponde desde la posición 1 a la posición 138, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 2 del listado de secuencias:

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

[0117] La secuencia de punto caliente H2 (5' a 3': -273 a -183) corresponde desde la posición 1 a la posición 91, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 3 del listado de secuencias:

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

[0118] La secuencia del punto caliente H3 (5' a 3': -164 a -80) corresponde desde la posición 1 a la posición 85, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 4 del listado de secuencias:

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

Ejemplo 3: ARNap que promueve la expresión del ARNm de *Thpo* en una célula hepática de ratón

(1) Cultivo celular y transfección

[0119] El cultivo de células se ha descrito en el ejemplo 2. Las células hepáticas embrionarias de ratón (BNL.CL2) se colocaron en una placa de 6 pocillos, en una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Según las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar el ARNap de *Thpo* de ratón en una concentración de 10 nM, la duración de la transfección fue de 72 h, y se utilizaron 2 pocillos replicados en cada tratamiento.

(2) RT-qPCR de dos pasos

[0120] Tras la transfección, se desecharon los medios, se añadió a cada pocillo 500 µl de amortiguador de lisis celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. El ARN se extrajo con el kit RNeasy de Qiagen, se transcribió en dirección inversa y se sometió a un análisis por qPCR en el sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) y cada muestra se

amplificó repetidamente en 3 pocillos replicados. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Preparación de la reacción de RT

Reactivo (reacción de RT 1)	Volumen	Reactivo (reacción de RT 2)	Volumen
5 × amortiguador eliminador de ADN genómico	2 µl	5 × amortiguador primeScript 2	4 µl
Eliminador de ADN genómico	1 µl	Mezcla de enzima PrimeScript 1 de RT	1 µl
Cantidad total de ARN (1 µg) + D.W	7 µl	Mezcla de cebadores de RT	1 µl
Volumen final	10 µl	dH ₂ O sin RNasa	4 µl
2 min a 42 °C y conservado a 4 °C		Reacción de RT 1	10 µl
		Volumen final	20 µl
		15 min a 37 °C, 5 s a 85 °C y conservado a 4 °C	

Tabla 6. Preparación de la reacción de RT-qPCR

Reactivo	Volumen
SYBR Premix Ex Taq II (2 ×)	5 µl
ROX reference dye II (50 ×)	0,2 µl
Mezcla de cebadores directo e inverso (5 µM)	0,8 µl
ADNc (productos RT)	4 µl
Suma	10 µl

[0121] Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 30 s a 95 °C, 5 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 40 ciclos de amplificación. La amplificación del gen *Thp* con el par de cebadores *Thpo* F1/R1 sirvió de control interno. Los cebadores de amplificación se muestran en la Tabla 2.

[0122] Para calcular el valor de expresión (E_{rel}) del *Thpo* (gen diana) de una muestra transfectada con ARN_{ap} en relación con el tratamiento control (simulación), se insertaron los valores Ct del gen diana y de un gen de control interno en la fórmula 2 para su cálculo.

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

Fórmula 2

[0123] La **FIGURA 3** muestra los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con diferentes ARN_{ap} de ratón. La expresión relativa del ARNm de *Thpo* de ratón con ARN de interferencia pequeño (ARN_{ip}) en el grupo DS03-432i se redujo en un 53,5 % en comparación con el grupo control, utilizando el tratamiento control como control de transfección testigo. Este resultado indica que este ARN_{ip} fue satisfactorio como transfección de ARN de interferencia pequeño control. Los siguientes grupos con diferentes ARN_{ap} incluyen DS03-0007 (RAG3-424), DS03-0014 (RAG3-425), DS03-0022 (RAG3-243) y DS03-0024 (RAG3-151) y mostraron mayores valores de expresión relativa del ARNm en comparación con el grupo control,

que aumentó en un 25,5 %, 16,5 %, 16 % y 41 %, respectivamente. Este resultado indica que los ARNap activadores seleccionados al azar son capaces de promover la expresión del ARNm de *Thpo* en las células BNL.CL2.

Ejemplo 4: ARNap de *Thpo* de ratón que promueve la expresión del ARNm de *Thpo* en las células LPC-H12

[0124] El cultivo de células se ha descrito en el ejemplo 2. Las células de cáncer hepático de ratón (LPC-H12) (BNBIO, BNCC101945) se colocaron en una placa de 6 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo. Según las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar el ARNap de *Thpo* de ratón en una concentración de 10 nM durante 72 h. Se utilizaron dos pocillos replicados para cada tratamiento. La RT-qPCR de dos pasos se ha descrito en el ejemplo 3.

[0125] La **FIGURA 4** muestra los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con diferentes ARNap. La expresión relativa del ARNm del grupo de ARNip de ratón (DS03-432i) se redujo en un 47 % en comparación con el grupo control, utilizando el tratamiento control como control de transfección testigo. Este resultado indica que este ARNip fue satisfactorio como transfección de ARN de interferencia pequeño control. Los valores de expresión relativa del ARNm de los grupos DS03-0007 (RAG3-424), DS03-0019 (RAG3-453), DS03-0022 (RAG3-243), DS03-0024 (RAG3-151) y DS03-0027 (RAG3-134) fueron superiores a los del grupo control y los valores de expresión relativa del ARNm aumentaron en un 52 %, 90 %, 30,5 %, 11,5 % y 34 %, respectivamente, y el efecto de activación de DS03-0019 fue especialmente evidente (90 %). Los resultados muestran que los ARNap activadores seleccionados al azar son capaces de promover la expresión del ARNm de *Thpo* en diferentes grados en las células LPC-H12.

Ejemplo 5: ARNap de *Thpo* de ratón que promueve la expresión del ARNm de *Thpo* en células hepáticas primarias de ratón

Cultivo y transfección de células hepáticas primarias de ratón

[0126] Los ratones C57 hembras (de 6 a 8 semanas de edad, de aproximadamente 25 g de peso, adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Universidad de Yangzhou) se aclimataron en la sala de animales para ratones durante 3 días y se aislaron células primarias hepáticas de ratón mediante un método de perfusión en dos pasos. El funcionamiento específico del método de perfusión en dos pasos se describe de la siguiente manera: los ratones anestesiados se mantuvieron con isoflurano, se esterilizaron con alcohol y la cavidad abdominal de los ratones se abrió con tijeras para exponer la vena porta hepática y la vena cava inferior; se introdujo una aguja en la vena porta hepática,

y se utilizó una bomba peristáltica para infundir la preperfusión (HBSS+HEPES+EGTA) a 37 °C a una velocidad de 1 a 2 ml/min, y el hígado del ratón se hinchó y se volvió blanco, lo que indicaba que la perfusión había sido satisfactoria; se cortó la vena cava inferior y se aumentó gradualmente la velocidad de perfusión hasta 7 a 9 ml/min, la perfusión se realizó durante 10 a 15 min; se añadió solución de colagenasa para digestión durante unos 15 min y la velocidad de perfusión fue de 5 a 8 ml/min. Tras la digestión, el hígado se transfirió a una placa petri y se recogieron las células hepáticas, se pasaron por un filtro de malla de 200, se lavaron 3 veces con medio DMEM y se centrifugaron (100 g) a 4 °C durante 5 min. Las células se cultivaron a 2×10^5 células/pocillo (placa de pocillos recubierta de colágeno) en un medio DMEM-L con un 10 % de suero, el medio DMEM-L sin suero se sustituyó después de 4 a 6 h, y las células se cultivaron durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar el ARNap de *Thpo* de ratón en una concentración de 10 nM durante un periodo de 72 h. Se utilizaron dos pocillos replicados en cada tratamiento. La RT-qPCR de dos pasos se ha descrito en el ejemplo 3.

[0127] La **FIGURA 5** muestra los valores de expresión relativa del ARNm de *Thpo* tras el tratamiento de las células con diferentes ARNap de ratón. Los valores de expresión relativa del ARNm de los grupos DS03-0007 (RAG3-424), DS03-0012 (RAG3-204), DS03-0014 (RAG3-425), DS03-0019 (RAG3-453), DS03-0022 (RAG3-243), DS03-0024 (RAG3-151) y DS03-0027 (RAG3-134) fueron superiores a los del grupo control y todos ellos aumentaron en un 33,5 %, 25,5 %, 51,5 %, 44,5 %, 28,5 %, 26 % y 34,5 %, respectivamente, en comparación con el grupo control, utilizando el tratamiento control como control de transfección testigo. Los resultados muestran que los ARNap activadores seleccionados al azar son capaces de promover la expresión del ARNm de *Thpo* en células primarias hepáticas de ratón.

Ejemplo 6: Ensayo *in vivo* de la activación ARNap de *Thpo* del gen *Thpo* en ratón

Preparación de la formulación de oligonucleótidos

[0128] Basándose en el método publicado de preparación de nanopartículas lipídicas (LNP) (ver CN104873464B, CN102625696B, US 9.394.234 B2, WO 2010/144740A1, US 8.158.601 B2, y US 8.802.644 B2), la LNP se preparó con un método mejorado. La LNP resultante se utilizó para formular el oligonucleótido. El método específico utilizado se describe a continuación.

[0129] Preparación de la solución madre de ARNip (DS03-432i) y ARNap (RAG3-151/DS03-0024) de *Thpo*: se prepararon soluciones madre de ARNip (DS03-432i) y ARNap (RAG3-151/DS03-0024) de *Thpo* con una concentración teórica final de 5 mg/ml disolviendo el ARNip (DS03-432i) y el ARNap (RAG3-151/DS03-0024) con agua DEPC. Se tomaron las cantidades apropiadas de ARNip (DS03-432i) y ARNap (RAG3-151/DS03-0024) y se diluyeron 200 veces con PBS para determinar las concentraciones de ARNip (DS03-432i) y ARNap (DS03-0024).

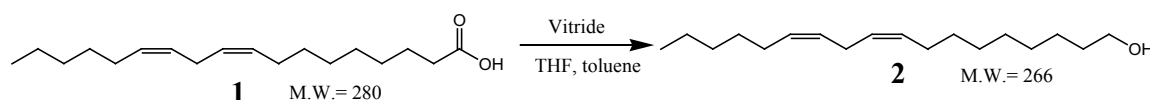
Tabla 7. Concentraciones de ARN de ARNip (DS03-432i) y ARNap (DS03-0024)

Muestra	Concentración de determinación de ARN (ng/μl)	Factor de dilución	Concentración de la solución madre de ARN (mg/ml)
DS03-432i	41	200	8,2
DS03-0024	41	200	8,2

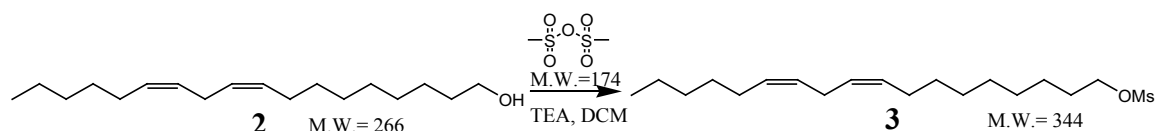
Tabla 8: Secuencias de dsCon2 y ARNip (DS03-432i)

ARN bicatenarios	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
dsCon2	ACUACUGAGUGACAGUAGATT (ID SEC N.º: 303)	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT (ID SEC N.º: 304)
DS03-432i	GGACUUUAGCCUGGGAGAATT (ID SEC N.º: 305)	UUCUCCCAGGCUAAAGUCCTT (ID SEC N.º: 306)

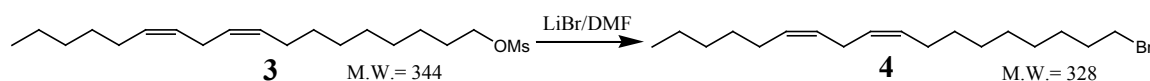
Preparación del lípido D-Lin-MC3: en un método de la publicación de la patente (ver Lipid Formulation, Publication No.: US 2010/0324120 A1), el lípido D-Lin-MC3 se sintetizó químicamente de la siguiente manera.



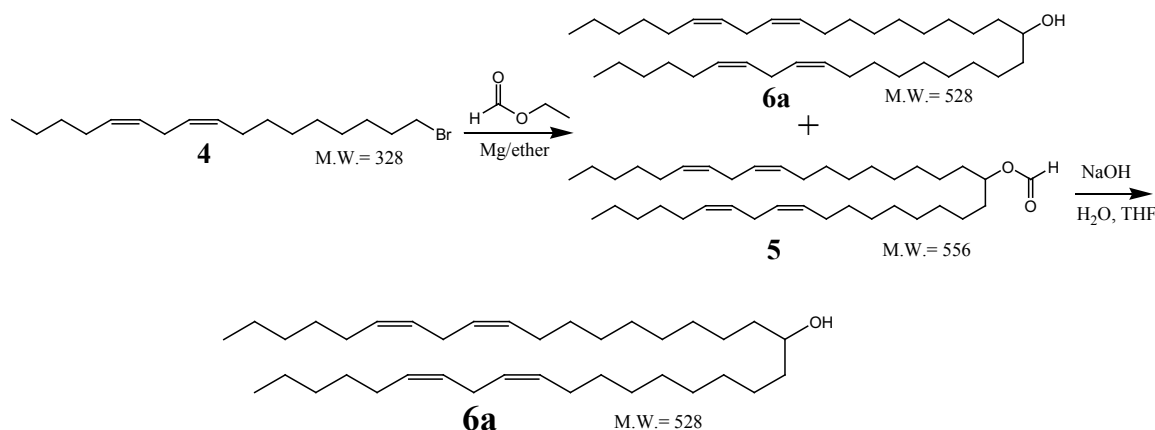
[0130] Se purgó un reactor de vidrio de 1 litro con argón seco y se enfrió a 0 °C mediante un baño de acetona y hielo seco. Se añadieron 25 g de la reacción 1 (ácido linoleico) y 300 ml de THF. Se añadieron lentamente, gota a gota, 60 ml de bis(2-metoxietoxi)dihidruro de aluminio de sodio (70 % en peso/vol) en tolueno a un reactor. Una vez completada la adición gota a gota, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h. Se tomó una pequeña muestra y se monitorizó la reacción del material de partida mediante TLC. Una vez completada la reacción, se añadió lentamente una solución saturada de sulfato de sodio. Una vez completada la adición, se añadieron 130 ml de acetato de etilo, gota a gota, durante 30 min y se agitó enérgicamente. La mezcla de reacción se filtró, el sólido se lavó con 90 ml de acetato de etilo y las fases orgánicas se combinaron y concentraron. El producto se disolvió en 80 ml de acetato de etilo, se lavó dos veces con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. Las fases orgánicas se filtraron y concentraron, y el disolvente orgánico se eliminó utilizando una bomba de vacío para obtener el producto 2 (17,49 g).



[0131] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco, se añadieron 17 g del producto 2 y 150 ml de diclorometano, se añadieron 40 ml de trietilamina y 1 g de 4-dimetilaminopiridina, y la mezcla se enfrió a -10 °C en un baño de acetona y hielo seco. Se disolvieron 30 g de anhídrido metanosulfónico en 45 ml de diclorometano y se añadieron lentamente, gota a gota, al reactor. Tras la finalización de la adición gota a gota de la mezcla de reacción, la reacción se mantuvo a 0 °C durante 1 h. La reacción del material de partida se monitorizó mediante TLC. Una vez completada la reacción, se añadieron 80 ml de agua helada a la mezcla de reacción, se separó la mezcla y se extrajo la fase acuosa con 40 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con ácido clorhídrico diluido, agua y solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Las fases orgánicas se filtraron y concentraron, el disolvente orgánico se eliminó utilizando una bomba de vacío para obtener el producto 3 (22,3 g).

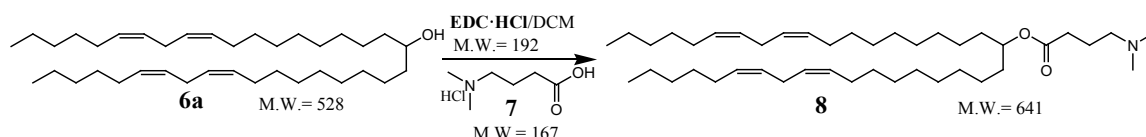


[0132] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco y, a continuación, se añadieron 100 ml de DMF y 22 g del producto 3, y la solución se enfrió a -10 °C en un baño de acetona y hielo seco. Se disolvieron 8,5 g de LiBr en 80 ml de DMF, se agitó y se añadió lentamente, gota a gota, al reactor. Una vez completada la adición gota a gota, la mezcla de reacción se calentó a 45 °C y se agitó para que reaccione durante 18 a 20 h. La reacción del material de partida se monitorizó mediante TLC. Una vez completada la reacción, se añadieron 300 ml de agua y se extrajeron con 240 ml de *n*-hexano, y la fase acuosa se extrajo de nuevo con *n*-hexano. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua y solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Las fases orgánicas se filtraron y concentraron, y el disolvente orgánico se eliminó utilizando una bomba de vacío para obtener el producto bruto (16,76 g). La mezcla se purificó con gel de sílice por una malla de 60 a 120 (*n*-hexano como fase móvil) para obtener el producto 4 (13,86 g).



[0133] Se purgó un matraz de tres cuellos de 1 litro con argón seco y se dispuso, adicionalmente, un dispositivo de reflujo. Se añadieron al reactor 2 g de virutas de magnesio y 12 ml de éter dietílico anhidro. Se disolvieron 13 g del producto 4 en 40 ml de éter dietílico anhidro. Con la protección del

argón, se añadieron 8 ml de la mezcla de reacción, gota a gota, al reactor y, además, se añadieron 0,2 ml de dibromometano. El reactor se calentó a 40 °C en un baño de agua. Una vez iniciada la reacción, el calentamiento se detuvo y los 32 ml restantes de la mezcla de reacción se añadieron, gota a gota, al reactor y se dejó que la mezcla mantuviera un ligero reflujo. Una vez completada la adición gota a gota, la mezcla de reacción se calentó para mantener el estado de reflujo (aproximadamente 45 °C) y se dejó reaccionar durante 1 h. Una pequeña muestra se amortiguó con agua y la reacción del material de partida se monitorizó por TLC. Una vez completada la reacción de los materiales de partida, la mezcla de reacción se enfrió por debajo de los 10 °C en un baño de hielo y, a continuación, se añadió lentamente la solución de formiato de etilo. Una vez completada la adición gota a gota, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añadieron 56 ml de agua helada y una solución de ácido sulfúrico al 10 %, se separaron las fases orgánicas y se extrajo la fase acuosa con éter dietílico. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y concentró, y el disolvente orgánico se eliminó utilizando una bomba de vacío para obtener el producto bruto (13 g). El producto bruto se disolvió en 100 ml de etanol al 85 %, se añadieron 7 g de NaOH sólido, se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y se monitorizó la reacción del material de partida mediante TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se extrajo con éter dietílico, y las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con una solución saturada de NaCl. La mezcla de reacción se secó con sulfato de sodio anhidro. Las fases orgánicas se filtraron y se concentraron. El producto bruto se purificó con gel de sílice, por una malla de 60 a 120 (4 % de éter/*n*-hexano) para obtener el producto 6 (10,4 g).

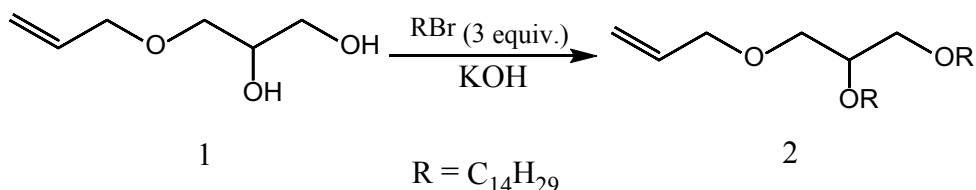


[0134] El producto de reacción 6 (3 g) se añadió a un matraz de 100 ml y se disolvió en diclorometano (24 ml), se añadió el producto de reacción 7 (clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butanoico) (1,1 g)y, luego, se añadieron diisopropiletilamina (1,5 mL) y 4-dimetilaminopiridina (0,09 g). Tras agitar a temperatura ambiente durante 5 min, se añadió EDC HCl (1,7 g) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción del material de partida se monitorizó mediante TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con 20 ml de diclorometano. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con solución saturada de NaHCO₃, agua y solución saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se filtró, y las fases orgánicas se concentraron para obtener casi el producto bruto (3,3 g). La mezcla de reacción se aisló mediante cromatografía (elución en serie con metanol/diclorometano del 1 % al 5 %) para obtener el producto 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).

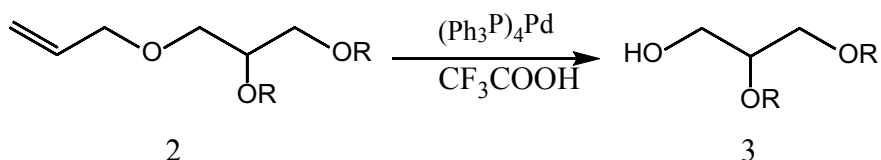
Preparación de PEG-c-DMA

Se preparó PEG-c-DMA mediante el siguiente procedimiento químico:



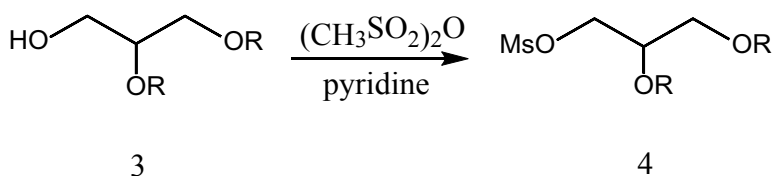
Preparación del producto 2

[0135] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco, se colocó una mezcla de 9 g del producto de reacción **1**, (3-aliloxi-1,2-propanediol), 60 g de 1-bromotetradecano y 15,5 g de hidróxido potásico en 500 ml de benceno anhidro, se sometió a reflujo durante la noche y se extrajo con un divisor Dean-Stark. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla de reacción con 200 ml de benceno anhidro. Las fases orgánicas se lavaron con agua y solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente orgánico se eliminó mediante una bomba de vacío para obtener un aceite amarillo claro (53 g). La mezcla de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: malla de 230 a 400, 1300 ml) y se utilizó como fase móvil una elución en serie con acetato de etilo/n-hexano del 0 al 5 %. El producto **2** pesaba 33 g.



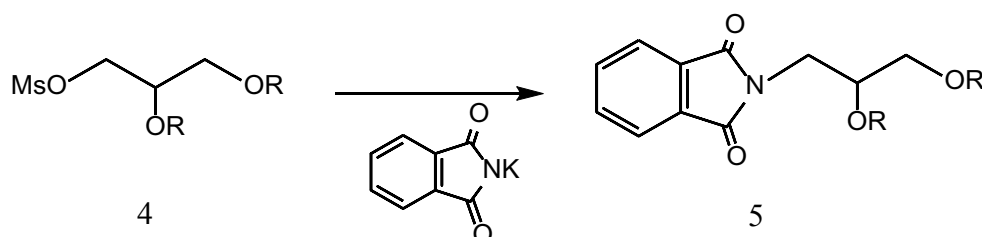
Preparación del producto 3

[0136] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco y se añadieron 45 ml de ácido trifluoroacético para obtener la solución de etanol del producto **2** (se disolvieron 33 g del producto **2** en 500 ml de etanol). Tras añadir 10 g de tetrakis(trifenilfosfina)paladio, la mezcla se sometió a reflujo durante la noche en ausencia de luz. Tras la finalización de la reacción, el disolvente orgánico se eliminó mediante una bomba de vacío para obtener un aceite marrón. El producto bruto se purificó con una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: malla de 230 a 400, 1500 ml) y se tomó como fase móvil la elución en serie con metanol/diclorometano del 0 al 1 %. El producto final **3** (19 g) consistía en una cera amarilla.



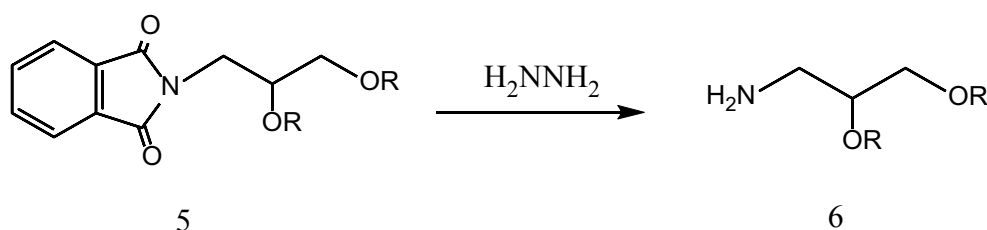
Preparación del producto 4

[0137] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco y se disolvieron 13,8 g de anhídrido metanosulfónico en 150 ml de diclorometano en el reactor. Se añadieron, gota a gota, 6,4 mL de piridina al reactor. Se disolvieron 19 g del producto **3** en 150 ml de cloruro de metileno y se añadieron al sistema de reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente con la protección del argón durante toda la noche. Una vez completada la reacción, el producto se diluyó con 200 ml de diclorometano, se lavó con agua y solución saturada de NaCl, y se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria para obtener un producto bruto de cera amarillo **4** (22,1 g).



Preparación del producto 5

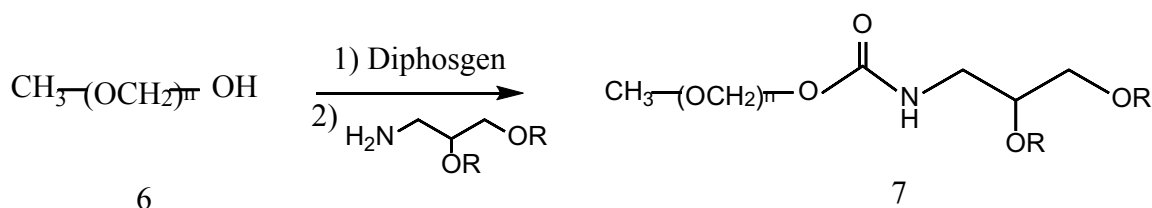
[0138] Se purgó un reactor de vidrio seco de 1 litro con argón seco y se mezclaron 22 g de producto **4** y 19 g de ftalimida de potasio, se disolvieron en 400 ml de solución de DMF, se calentaron a 70 °C y se agitaron durante la noche para obtener una suspensión amarilla. Después de que la solución de la reacción se enfriara a temperatura ambiente, se vertió en 800 ml de agua helada. La fase acuosa se lavó con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua y solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente orgánico se eliminó mediante una bomba de vacío. La mezcla se disolvió en 500 ml de *n*-hexano, se filtró y se lavó con 100 ml de hexano. El disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria para obtener 20,7 g de cera bruta. El producto bruto se purificó con una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: malla de 230 a 400, 600 ml) y se utilizó como fase móvil una elución en serie con acetato de etilo/*n*-hexano del 0 al 5 %. Se obtuvo un producto de cera blanca puro **5** (13,4 g).



Preparación del producto 6

[0139] Se disolvieron 13,4 g del producto **5** y 15,8 ml de hidrato de hidracina en 300 ml de solución de etanol a reflujo durante la noche para obtener un sólido blanco. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y, a continuación, se filtró. El sólido se lavó dos veces con etanol (100 ml). Las

fases orgánicas se combinaron, y el disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria, se disolvió en 500 ml de cloroformo y se filtró. El sólido se lavó una vez con 100 ml de cloroformo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua y solución saturada de NaCl y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente orgánico se eliminó mediante una bomba de vacío para obtener un producto bruto aceitoso de color claro (10,6 g). El producto bruto se purificó con una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: malla de 230 a 400, 300 ml) y se tomó como fase móvil la elución en serie con metanol/cloroformo del 0 al 10 %. Se obtuvo un producto bruto aceitoso de color claro (10 g).



Preparación del producto 7

[0140] Se disolvieron 29,5 g de monometoxiglicol 2000 en 150 ml de benceno anhidro, y el disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria. El producto se disolvió en 250 ml de diclorometano anhidro, se añadió a un reactor de vidrio seco de 1 litro y se purgó con argón seco. Se añadieron 7,3 g de cloroformato de tricloroetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria, se añadieron 150 ml de benceno anhidro y el disolvente orgánico se eliminó por evaporación rotatoria. Se disolvieron 10 g del producto **6** en 150 ml de diclorometano, se añadieron 3,2 mL de trietilamina y se añadieron a 1 litro de la reacción con la protección del argón y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto de la reacción se diluyó con 200 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se lavaron con una solución de HCl al 1 %, después se lavaron con agua, con una solución de carbonato sódico al 0,1 % y con agua y una solución saturada de NaCl y, finalmente, se secaron con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente orgánico se eliminó mediante una bomba de vacío para obtener un producto bruto pastoso de color claro (46 g). El producto bruto se purificó con una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: malla de 230 a 400, 1600 ml). La elución en serie con metanol/cloroformo del 0 al 10 % se tomó como fase móvil para obtener el producto PEG-c-DMA y el reactivo restante que era una cera blanca o amarilla clara. La mezcla cerosa se añadió a 150 ml de éter dietílico para disolver el reactivo que no había reaccionado. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó dos veces con éter dietílico y se secó al vacío para obtener el producto **7** (32,2 g). ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ : 5,15 (1H, m, NH), 4,21 (2H, m, CH_2), 3,80-3,1 (8H, m), 3,60 (130H, s, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,34 (3H, s, OCH_3), 2,42 (2H, m, NCH_2), 1,49 (4H, m, 2 x CH_2), 1,21 (44H, s, 22 x CH_2), 0,84 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

[0141] Preparación de la solución madre de lípidos: el lípido D-Lin-MC3, el 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina, es decir, el DSPC (Avanti Polar Lipid, 850365), el colesterol (Sigma, C3045) y el PEG-C-DMA se equilibraron a temperatura ambiente durante unos 30 min antes de pesarse. El lípido D-Lin-MC3 se formuló en 40 mg/ml de solución madre con etanol al 100 %, el colesterol se formuló en 20 mg/ml de solución madre con etanol al 100 %, y el DSPC se formuló en 20 mg/ml de solución madre con etanol al 100 %. El lípido de acción prolongada se formuló como 50 mg/ml de solución madre en etanol al 100 %.

[0142] Preparación de vesículas preformadas (PFV): la D-Lin-MC3, el colesterol, la DSPC, el PEG-c-DMA y el etanol anhidro se formularon en soluciones lipídicas de etanol en una relación molar de 40:40:10:10, y la cantidad necesaria de cada lípido se mostró en la Tabla 9. Una vez disueltos todos los lípidos, la solución lipídica de etanol anterior se añadió al amortiguador de la formulación (50 mM de ácido cítrico, pH = 3,0) con agitación hasta alcanzar una concentración final de etanol del 30 % (v/v). A temperatura ambiente, el extrusor de lípidos Avanti, equipado con una capa de membrana Nuclepore, se extruyó repetidamente para obtener PFV con un tamaño de partícula uniforme. Se midió el tamaño de las partículas del PFV extrudido por la extrusora utilizando un analizador de tamaño de partículas.

Tabla 9. Requisitos de los lípidos en la formulación de F113

<u>Volumen total:</u> 10 ml		
<u>Volumen de etanol:</u> 3 ml de etanol con una concentración del 30 % (v/v)		
Lípido	Concentración (mg/ml)	Cantidad necesaria (ml)
D-Lin-MC3	40	1,25
DSPC	20	0,462
Colesterol	20	0,904
PEG-c-DMA	50	0,596
Adición de etanol		0,286

[0143] Para preparar las formulaciones de liposomas de ARNip (DS03-432i) y ARNap (RAG3-151/DS03-0024), el PFV se dispensó en tubos Falcon de 15 ml y se preequilibró durante 5 min en un baño de agua a 35 °C. Se formularon 200 microlitros (8,2 mg/ml) de las soluciones madres de ARNip (DS03-432i) y ARNap (DS03-0024) en 0,4 ml de una solución que contenía ARNip, amortiguador de formulación, solución de etanol y una solución que contenía ARNap, formulación del amortiguador, solución de etanol en una relación de solución madre de ARN:formulación del amortiguador:solución de etanol = 200 µl:100 µl:100 µl. El ARNip (DS03-432i) o el ARNap (RAG3-151/DS03-0024)/formulación del amortiguador/solución de etanol se añadieron, lentamente, a la PFV mencionada y se incubaron a 35 °C durante 30 min. A continuación, las formulaciones liposomales de ARNip (DS03-432i) y ARNap (RAG3-151/DS03-0024) se dializaron durante toda la noche

utilizando una bolsa de diálisis MD24, solución amortiguadora de fosfato 1× (PBS), y el producto recuperado tras la diálisis fue el oligonucleótido formulado en LNP utilizado en el experimento. El oligonucleótido formulado en LNP se filtró y esterilizó utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm, y se utilizaron 20 µl de productos esterilizados para determinar la tasa de encapsulación.

(2) Inyección en la vena de la cola del ratón del oligonucleótido formulado en LNP

[0144] Para los experimentos se prepararon 15 ratones Balb/c machos (adquiridos en SPF [Beijing] Biotechnology Co., Ltd.) de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de 25 g. Tras aclimatare en una sala de animales para ratones durante 3 días, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos con 5 ratones en cada grupo en función del peso corporal. Se administró un control (PBS), *Thpo*-ARNip formulado en LNP (DS03-432i, 5 mg/kg) y *Thpo*-ARNap formulado en LNP (RAG3-151/DS03-0024, 5 mg/kg), respectivamente, por inyección en la vena de la cola en una dosis de 20 µl/kg. Setenta y dos horas después de la administración, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se recogieron 200 µl de sangre por punción cardíaca para analizar la concentración de proteína THPO en el suero. Una vez finalizada la extracción de sangre, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia por inhalación de dióxido de carbono. Los ratones del experimento que iban a ser sacrificados se colocaron en una caja de experimentación que se podía cerrar para liberar una gran cantidad de dióxido de carbono, de modo que los ratones del experimento se asfixiaran y murieran.

(3) Evaluación de la proteína THPO en suero de ratón mediante ELISA

[0145] Se dejaron reposar 40 microlitros de sangre total de los ratones a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se centrifugó (4 °C, 13.000 rpm, 15 min) para recoger el suero. Se utilizó un kit ELISA con THPO de ratón (R&D Systems, MTP00) para determinar el contenido de THPO en el suero recolectado. A continuación se describen brevemente los procedimientos, que se basaron en las instrucciones proporcionadas en el kit. Se prepararon suficientes tiras (proporcionadas en el kit) y se añadieron 50 µl de RD1-23 en dos pocillos replicados para cada grupo. Se añadieron 50 microlitros de estándar, control y muestra, y la mezcla se mezcló, uniformemente, golpeando levemente las tiras y colocándolas después a temperatura ambiente durante 2 h. Se descartó el líquido, se lavó la mezcla 4 veces con 400 µl de amortiguador de lavado y se añadieron 100 µl de conjugado de Thpo de ratón a cada pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se descartó el líquido, se lavó la mezcla 4 veces con 400 µl de amortiguador de lavado y se añadieron 100 µl de sustrato a cada pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo, la mezcla se mezcló uniformemente golpeando ligeramente las tiras y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un instrumento de etiquetado de enzimas (Infinite M200 Pro). Se preparó una curva de garantía utilizando una concentración estándar conocida (4000 pg/ml), proporcionada en el kit. La absorbancia de la muestra a analizar se restó de la de un control testigo (0 pg/ml) y la concentración

de proteína THPO (pg/ml) se calculó a partir de la curva estándar.

(4) Análisis estadístico

[0146] Las diferencias entre los grupos de las variables continuas se compararon mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y entre los grupos mediante las comparaciones múltiples de Tukey. Los grupos con menos de 0,05 de valor P fueron significativamente diferentes.

[0147] La **FIGURA 6** muestra la concentración de la proteína Thpo en el suero de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento. En comparación con el grupo control (PBS), el contenido de proteína Thpo del grupo de *Thpo-ARNip* formulado en LNP (DS03-432i) se redujo en un 16,1 % y fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Este resultado indica que el *Thpo-ARNip* formulado en LNP (DS03-432i) puede proporcionar eficientemente el *Thpo-ARNip* y reducir significativamente el contenido de la proteína *Thpo-ARNip* en los ratones, lo cual es esperado y consistente con los resultados del estudio celular *in vitro*. En comparación con el grupo control, el contenido de proteína Thpo del grupo de *Thpo-ARNap* formulado en LNP (DS03-0024) se redujo en un 32,9 % y fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Este resultado indica que el *Thpo-ARNap* formulado en LNP (DS03-0024) puede proporcionar eficientemente el *Thpo-ARNap* y aumentar significativamente el contenido de la proteína Thpo en los ratones. N=5; (N, número de muestras); *** representa $p < 0,001$.

Ejemplo 7: La administración de ARNap en la vena de la cola de los ratones aumentó el nivel de Thpo en suero y el recuento de plaquetas en sangre periférica

[0148] Se prepararon 32 ratones Balb/c machos (de 6 a 8 semanas de edad, de 28 a 30 g de peso, adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Universidad de Yangzhou). Tras aclimatarse en una sala de animales para ratones durante 7 días, los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos con 8 ratones en cada grupo en función del peso corporal. Los cuatro grupos consistieron en un grupo control (PBS) y 3 grupos que recibieron diferentes dosis de *Thpo-ARNap* formulado en LNP (DS03-0024, 1 mg/kg; DS03-0024, 3 mg/kg, y DS03-0024, 6 mg/kg), respectivamente. El fármaco se administró por inyección en la vena de la cola a un volumen de 10 ml/kg. Se recogieron 40 microlitros de sangre a través de la vena de la cola 1 día antes de la administración, y a los 2 días, 4 días, 6 días y 9 días después de la dosis para analizar la concentración de Thpo en el suero. Para analizar el número de plaquetas en sangre periférica, se anestesió a los ratones con isoflurano y se recogieron 800 µl de sangre por punción cardíaca 17 días después de la administración de la dosis. Una vez finalizada la extracción de sangre, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia por inhalación de dióxido de carbono. Los ratones del experimento que iban a ser sacrificados se colocaron en una caja de experimentación que se podía cerrar para liberar una gran cantidad de

dióxido de carbono, de modo que los ratones del experimento se asfixiaron y murieron.

[0149] (2) Ensayo de plaquetas en sangre periférica en ratones

[0150] Para analizar el recuento de plaquetas en sangre periférica de los ratones, se mezclaron, uniformemente, cinco microlitros de sangre total y 5 µl de heparina sódica al 0,01 % y se añadieron a 90 µl de solución salina fisiológica (dilución 1:20). La mezcla se mezcló suavemente y se añadió a 200 µl de la capa superior del líquido de separación de plaquetas de la sangre (Solarbio, P1620) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 min a 250 ×g. A continuación, se recogieron 20 µl de la capa superior de enriquecimiento de plaquetas sanguíneas. Se añadieron 80 microlitros de amortiguador de tinción 1×FASC (R&D Systems, FC001) al sobrenadante recogido y 1 µl de anticuerpo CD41a (ThermoFisher, 11-0411-82) para unir las plaquetas. La mezcla se mezcló, uniformemente, y se dejó reposar a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 30 min. Una vez completada la reacción, la mezcla se centrifugó a temperatura ambiente (800 g, 5 min), el precipitado se resuspendió en 200 µl de PBS y se transfirió a una placa de ensayo marcada con enzimas para determinar el contenido de plaquetas. La preparación de la formulación de oligonucleótidos y los métodos para inyectar oligonucleótidos formulados con LNP en las venas de la cola de los ratones se describen en el ejemplo 6.

[0151] La **FIGURA 7** muestra que el ARNap de *Thpo* aumenta la concentración de la proteína Thpo en el suero de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento. Como se muestra en la **FIGURA 7A**, la concentración de referencia de la proteína Thpo en el suero de los ratones se determinó el día anterior a la administración y no hubo diferencias significativas en el nivel de suero para la proteína Thpo en los 4 grupos de ratones. La **FIGURA 7B** muestra las concentraciones de la proteína Thpo en el suero de los ratones recogido 2 días después de la administración. El nivel de proteína Thpo en suero en el grupo DS03-0024-3 mg/kg está aumentado en comparación con el grupo control (PBS), aunque no es estadísticamente significativo. La concentración de proteína Thpo en el grupo DS03-0024-6 mg/kg aumentó un 23,9 %, con una significación estadística de $p < 0,0001$. Este resultado indica que el *Thpo*-ARNap formulado en LNP puede entregar rápida y eficientemente el *Thpo*-ARNap y aumentar significativamente la concentración de la proteína Thpo en el suero de los ratones.

[0152] La **FIGURA 8** muestra que el ARNap de *Thpo* aumentó el número de plaquetas en ratones 6 días después de su administración. En comparación con el grupo control (PBS), los dos grupos de *Thpo*-ARNap formulado en LNP, DS03-0024, 1 mg/kg y DS03-0024, 3 mg/kg, aumentaron, aunque no de forma estadísticamente significativa, especialmente, el número de plaquetas en el grupo de *Thpo*-ARNap formulado en LNP (DS03-0024, 3 mg/kg), que aumentó en un 88,6 %. El número de plaquetas en el grupo de *Thpo*-ARNap formulado en LNP (DS03-0024, 6 mg/kg) aumentó en un 138,7 %, con una significación estadística de $p < 0,05$. Este resultado indica que el *Thpo*-ARNap formulado en LNP (DS03-0024, 6 mg/kg) puede aumentar el número de plaquetas 6 días después de

su administración.

[0153] La **FIGURA 9** muestra que el ARNap de *Thpo* aumentó el número de plaquetas en ratones 17 días después de su administración. El número de plaquetas en los ratones de los dos grupos de *Thpo*-ARNap formulado en LNP, DS03-0024, 1 mg/kg y DS03-0024, 3 mg/kg, respectivamente, determinado 17 días después de la administración, aumentó significativamente en comparación con el del grupo control (PBS), aumentando un 53,8 % y un 53,9 %, respectivamente, con una significación estadística ($P < 0,05$). El número de plaquetas en el grupo de *Thpo*-ARNap formulado en LNP (DS03-0024, 6 mg/kg) también tendió a aumentar. Este resultado indica que el aumento del recuento de plaquetas causado por el ARNap puede persistir durante al menos 17 días.

Ejemplo 8: Diseño y síntesis de ARNap dirigido al promotor del gen *THPO* humano

[0154] Para seleccionar ARNap funcionales capaces de activar la expresión del gen *THPO* humano, se utilizó una secuencia promotora de *THPO* con una longitud de 1382 pb como plantilla y se seleccionaron secuencias diana con una longitud de 19 pb desde -1382 pb secuencia arriba del TSS. A continuación, se eligieron las secuencias diana utilizando los siguientes criterios: (1) con un contenido de GC de entre el 40 % y el 65 %; (2) con menos de 5 nucleótidos idénticos continuos; (3) con 3 o menos secuencias de repetición de dinucleótidos; y (4) con 3 o menos secuencias de repetición de trinucleótidos. Tras la selección, las 833 secuencias diana restantes entraron en el proceso de cribado como candidatas. A partir de estas secuencias candidatas, se sintetizaron químicamente los correspondientes ARNap bicatenarios.

[0155] En el estudio, cada una de las cadenas sentido y antisentido del ARNap bicatenario presentaba 21 nucleótidos de longitud. Los 19 nucleótidos en la región 5' de la primera cadena de ácido ribonucleico (cadena sentido) del ARNap presentaban un 100 % de identidad con respecto a la secuencia diana del promotor, y el extremo terminal 3' de la primera cadena de ácido ribonucleico contenía una secuencia TT. Los 19 nucleótidos en la región 5' de la segunda cadena de ácido ribonucleico eran complementarios a la secuencia de la primera cadena de ácido ribonucleico y el extremo 3' de la segunda cadena de ácido ribonucleico contenía una secuencia TT. Las dos cadenas mencionadas del ARNap se mezclaron en una relación molar de 1:1 y, tras el apareamiento, se formó un ARNap bicatenario.

[0156] La secuencia del promotor de *Thpo* humano se muestra como sigue, que corresponde desde la posición 1 a la posición -1382 de 5' a 3' de la ID. SEC. N.º: 600 del listado de secuencias:

```
-1382 gtccatcagc cgatctcccc ctgcctgggc ccacagcgcc ccccaaacc  
-1332 tcaccacct ctctactgc ctgcctgcc tcctacctt ctcttgagg  
-1282 tcgctcctca ttctgtgtt acccaggaca gggacctagc cagaaaccgg  
-1232 cagcattccc cttctgtgg agtgacagta tctcctctc attgtaact
```

-1182 atcctcagge gcattcgaca gtccctctt gctttctac ccccttctt
-1132 cacccaaggg accctctgcc tctccagccc actcccagcc tctttctct
-1082 tggttccctg gtcatgctg cctccctgtc tctgtctct cctcccaca
-1032 cacaccact atcctcccag ctatcccagc accctcctt ctaatttgg
-982 gagacatctc gtctggctgg acgggaaaat tccaggatct aggccacact
-932 tctcagcaga catgcccac cttggggagg aggaacagga gagagcctga
-882 ggaagtctg ggggacaggg ggatgatggg atcaaggtca ggccaggaag
-832 cccctgagga cagagactgt ggggagactg ggactgggaa gaaagcaaag
-782 gagctagagc cagggccaaa ggaaaagggg ggccagcagg gaggtatttg
-732 cggggggaggt ccagcagctg tcttctctaa gacagggaca catgggcctg
-682 gttattctc ttgtcacatg tggaacggta ggagatggaa gacggagaca
-632 gaacaagcaa aggagggccc tgggcacaga ggtctgtgtg tgtagccatc
-582 taagccactg gaccccagca gacgagcacc taagctcagg ctaaccag
-532 tgcacgtgtg cgcacataca tgtccccgc acctgacagt cactcaacc
-482 cgtccaaacc ctttcccat aacaccaacc cataacagga gatttctc
-432 atgtgggcaa tatccgtgtt cccacttcga aagggggaat gacaagatag
-382 gactccctag gggattacag aaagaaaagc aggaaagcaa gcatcctgtt
-332 ggatttcagc agcaggtatg atgtccaggg aaaagaaatt tggatagcca
-282 gggagtgaag accccacaa tcttaacaa gacctctgt cttctcccc
-232 agcaacacaa atgtctgcc agattcctcc tggaaaaaaa cttctgctc
-182 tgtccccctc caggtcccag gttgcccac tccaggaaaa gatggatccc
-132 cctatccaaa tcttctccgt ggtgtgtgtg ggtggaggag tggaccctgg
-82 tccaggcagg ggctccaggg aagagaaggc gtcacttcg ggggcctca
-32 ccagtgtctg gtggctcct tctctgattg gg

Ejemplo 9: Cribado de alto rendimiento de ARNaps dirigidos al promotor del gen *THPO* humano

(1) Cultivo y transfección de células

[0157] Se cultivó una célula humana de cáncer hepático HepG2 (ATCC) en un medio MEM (Gibco) con un 10 % de suero bovino (Sigma-Aldrich) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células HepG2 se sembraron en una concentración de 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar ARN activadores pequeños en una concentración de 25 nM durante 72 h, con 2 pocillos replicados para cada tratamiento.

(2) RT-qPCR de un paso

[0158] Tras la transfección, se desecharon los medios y se lavó cada pocillo una vez con 150 µl de PBS. Tras el lavado, se añadieron 50 µl de amortiguador de lisis celular a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se tomó un microlitro de amortiguador de lisis celular de cada pocillo y se sometió a un análisis por qPCR en un sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) utilizando un kit TB GreenTM PrimeScripTM RT-PCR II de un paso (Takara,

RR086A). Cada muestra se amplificó repetidamente en 3 pocillos replicados. Las condiciones de la reacción PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 10: Preparación de la PCR

Reactivo	Volumen
2 × amortiguador de RT-PCR de un paso TB Green 4	2,5 µl
Mezcla de enzima de un paso PrimeScript 2	0,2 µl
Mezcla de cebadores directo e inverso (5 µM)	0,4 µl
dH ₂ O sin RNasa	1,4 µl
Lisado bruto (ARN)	0,5 µl
Suma	5 µl

[0159] Las condiciones de reacción fueron las siguientes: reacción de transcripción inversa (fase 1): 5 min a 42 °C, 10 s a 95 °C; reacción de PCR (fase 2): 5 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 45 ciclos de amplificación. *TBP* se utilizó como gen de control interno. Los cebadores de PCR utilizados para *THPO* y *TBP* se muestran en la Tabla 10, donde *THPO* se amplificó utilizando el par de cebadores de *THPO* F1/R1.

Tabla 11: Secuencias de cebadores para el análisis por RT-qPCR

Cebador	N.º de secuencia	Secuencia (5'-3')
<i>THPO</i> F	ID SEC N.º: 309	TCGTGACTCCCATGTCCTTC
<i>THPO</i> R	ID SEC N.º: 310	TGCCTTGGTCTCCTCCATCT
<i>TBP</i> F	ID SEC N.º: 311	TGCTCACCCACCAACAATTTAG
<i>TBP</i> R	ID SEC N.º: 312	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG
<i>HPRT1</i> F	ID SEC N.º: 313	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG
<i>HPRT1</i> R	ID SEC N.º: 314	TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC

[0160] Para calcular el valor de expresión (E_{rel}) del gen *THPO* (diana) de una muestra transfectada con ARN_{ap} en relación con el tratamiento control (simulación), los valores Ct del gen diana y de un gen de control interno se sustituyen en la fórmula 2 como se muestra en el ejemplo 3 para su cálculo.

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

Fórmula 2

[0161] en la que Ct_{Tm} fue el valor Ct del gen diana de la muestra de simulación; Ct_{Ts} fue el valor Ct del gen diana de la muestra tratada con ARN_{ap}; Ct_{Rm} fue el valor Ct del gen de control interno

de la muestra tratada con simulación; y CtRs fue el valor Ct del gen de control interno de la muestra tratada con ARNap.

(3) Cribado de ARNap funcionales

[0162] Para obtener los ARNap capaces de activar la transcripción de *THPO*, se transfectaron las células HepG2 con los 833 ARNap mencionados anteriormente en una concentración de 25 nM. Setenta y dos horas después, utilizando el mismo método descrito anteriormente, las células se lisaron y se sometieron a un análisis de RT-qPCR de un paso para obtener el valor de expresión relativa (en comparación con el grupo de tratamiento control) del gen *THPO* en cada muestra tratada con ARNap. Según se muestra en la Tabla 11, 158 (19 %) ARNap mostraron una alta activación, 243 (29,2 %) ARNap mostraron una activación leve y 432 (51,8 %) ARNap no afectaron a la expresión de *THPO*. La activación máxima fue de 5,15 veces; la inhibición máxima fue de 0,09 veces; y los ARNap con actividad de activación se denominan ARNap funcionales/activadores.

Table 12: Resultados del cribado de alto rendimiento de los ARNap de *THPO* humanos

Actividad de ARNap	Valor log ₂ (múltiplo) de los cambios en el ARNm de <i>THPO</i>	Cantidad de ARNap	Porcentaje
Activación alta	$\geq 0,58$ (1,50) $\sim \leq 2,36$ (5,15)	158	19 %
Activación leve	$\geq 0,13$ (1,10) $\sim < 0,58$ (1,50)	243	29,2 %
Sin efecto activador	$< 0,13$ (1,10)	432	51,8 %
Suma		833	100 %

[0163] En la **FIGURA 10** se muestra la actividad del ARNap de *THPO* humano en la modificación de la expresión de *THPO* ordenada de forma descendente. En la Tabla 13 se muestran las secuencias de los ARNap funcionales de *THPO* y su actividad para inducir la expresión del ARNm de *THPO*.

Tabla 13: Secuencias de ARNap funcionales de THPO humanos, sus secuencias diana y su actividad para inducir la expresión del ARNm deTHPO

ARNap	Secuencia diana (5'-3')	Secuencia sentido (5'-3') de ARNap	Secuencia antisentido (5'-3') de ARNap	Múltiplo de cambios en la expresión relativa del ARNm de <i>THPO</i>
RAG3A-889	AGCCTGAGGAAGTTCTGGG (ID. SEC. N.º: 606)	AGCCUGAGGAAGUUCUGGGTT (ID SEC N.º: 1048)	CCCAGAACUUCCUCAGGCUTT (ID SEC N.º: 1490)	5,1
RAG3A-723	TCCAGCAGCTGTCTTTCCT (ID SEC N.º: 607)	UCCAGCAGCUGUCUUUCCUTT (ID SEC N.º: 1049)	AGGAAAGACAGCUGCUGGATT (ID SEC N.º: 1491)	4,1
RAG3A-1069	ATGCCTGCCTCCCTGTCTC (ID SEC N.º: 608)	AUGCCUGCCUCCUGUCUCTT (ID SEC N.º: 1050)	GAGACAGGGAGGCAGGCAUTT (ID SEC N.º: 1492)	4
RAG3A-541	TTAACCCAGTGCACGTGTG (ID SEC N.º: 609)	UUAACCCAGUGCACGUGUGTT (ID SEC N.º: 1051)	CACACGUGCACUGGGUUAATT (ID SEC N.º: 1493)	3,4
RAG3A-480	TCCAAACCCTTTCCCCATA (ID SEC N.º: 610)	UCCAAACCCUUUCCCCAUATT (ID SEC N.º: 1052)	UAUGGGGAAAGGGUUUGGATT (ID SEC N.º: 1494)	3,1
RAG3A-980	GACATCTCGTCTGGCTGGA (ID SEC N.º: 611)	GACAUCUCGUCUGGCUGGATT (ID SEC N.º: 1053)	UCCAGCCAGACGAGAUGUCTT (ID SEC N.º: 1495)	3,1
RAG3A-462	AACACCAACCCATAACAGG (ID SEC N.º: 612)	AACACCAACCCAUAACAGGTT (ID SEC N.º: 1054)	CCUGUUAUGGGUUGGUGUUTT (ID SEC N.º: 1496)	3
RAG3A-787	CAAAGGAGCTAGAGCCAGG (ID SEC N.º: 613)	CAAAGGAGCUAGAGCCAGGTT (ID SEC N.º: 1055)	CCUGGCUCUAGCUCCUUUGTT (ID SEC N.º: 1497)	2,9
RAG3A-232	AGCAACACAAATGTCCTGC (ID SEC N.º: 614)	AGCAACACAAAUGUCCUGCTT (ID SEC N.º: 1056)	GCAGGACAUUUGUGUUGCUTT (ID SEC N.º: 1498)	2,9
RAG3A-727	GAGGTCCAGCAGCTGTCTT (ID SEC N.º: 615)	GAGGUCCAGCAGCUGUCUUTT (ID SEC N.º: 1057)	AAGACAGCUGCUGGACCUCTT (ID SEC N.º: 1499)	2,9
RAG3A-542	CTTAACCCAGTGCACGTGT (ID SEC N.º: 616)	CUUAACCCAGUGCACGUGUTT (ID SEC N.º: 1058)	ACACGUGCACUGGGUUAAGTT (ID SEC N.º: 1500)	2,8

RAG3A-748	AGCAGGGAGGTATTTGCGG (ID SEC N.º: 617)	AGCAGGGAGGUAUUUGCGGTT (ID SEC N.º: 1059)	CCGCAAAUACCUCCCUGCUTT (ID SEC N.º: 1501)	2,8
RAG3A-540	TAACCCAGTGCACGTGTGC (ID SEC N.º: 618)	UAACCCAGUGCACGUGUGCTT (ID SEC N.º: 1060)	GCACACGUGCACUGGGUUATT (ID SEC N.º: 1502)	2,8
RAG3A-1219	TCTGTGGAGTGACAGTATC (ID SEC N.º: 619)	UCUGUGGAGUGACAGUAUCTT (ID SEC N.º: 1061)	GAUACUGUCACUCCACAGATT (ID SEC N.º: 1503)	2,8
RAG3A-487	CAACCCGTCCAAACCCTTT (ID SEC N.º: 620)	CAACCCGUCCAAACCCUUTT (ID SEC N.º: 1062)	AAAGGGUUUGGACGGGUUGTT (ID SEC N.º: 1504)	2,7
RAG3A-559	GAGCACCTAAGCTCAGGCT (ID SEC N.º: 621)	GAGCACCUAAGCUCAGGCUTT (ID SEC N.º: 1063)	AGCCUGAGCUUAGGUGCUCTT (ID SEC N.º: 1505)	2,7
RAG3A-1308	CCTGCCTCCCTACCTTCTC (ID SEC N.º: 622)	CCUGCCUCCCUACCUUCTT (ID SEC N.º: 1064)	GAGAAGGUAGGGAGGCAGGTT (ID SEC N.º: 1506)	2,7
RAG3A-24	TGGTGGCTCCCTTCTCTGA (ID SEC N.º: 623)	UGGUGGCUCCCUUCUCUGATT (ID SEC N.º: 1065)	UCAGAGAAGGGAGCCACCATT (ID SEC N.º: 1507)	2,6
RAG3A-1169	TTCGACAGTCCCCTCTTGC (ID SEC N.º: 624)	UUCGACAGUCCCCUCUUGCTT (ID SEC N.º: 1066)	GCAAGAGGGGACUGUCGAATT (ID SEC N.º: 1508)	2,6
RAG3A-1256	GACAGGGACCTAGCCAGAA (ID SEC N.º: 625)	GACAGGGACCUAGCCAGAATT (ID SEC N.º: 1067)	UUCUGGCUAGGUCCCUGUCTT (ID SEC N.º: 1509)	2,6
RAG3A-522	CGCACATACATGTGCCCCG (ID SEC N.º: 626)	CGCACAUACAUGUGCCCCGTT (ID SEC N.º: 1068)	CGGGGCACAUGUAUGUGCGTT (ID SEC N.º: 1510)	2,6
RAG3A-851	TCAAGGTCAGGCCAGGAAG (ID SEC N.º: 627)	UCAAGGUCAGGCCAGGAAGTT (ID SEC N.º: 1069)	CUUCCUGGCCUGACCUUGATT (ID SEC N.º: 1511)	2,6
RAG3A-1096	AGCCTCCTTTCTCTTGGTT (ID SEC N.º: 628)	AGCCUCCUUUCUCUUGGUUTT (ID SEC N.º: 1070)	AACCAAGAGAAAGGAGGCUTT (ID SEC N.º: 1512)	2,5
RAG3A-227	CACAAATGTCCTGCCAGAT (ID SEC N.º: 629)	CACAAAUGUCCUGCCAGAUTT (ID SEC N.º: 1071)	AUCUGGCAGGACAUUUGUGTT (ID SEC N.º: 1513)	2,5
RAG3A-1178	TCAGGCGCATTCGACAGTC (ID SEC N.º: 630)	UCAGGCGCAUUCGACAGUCTT (ID SEC N.º: 1072)	GACUGUCGAAUGCGCCUGATT (ID SEC N.º: 1514)	2,5
RAG3A-544	GGCTTAACCCAGTGCACGT (ID SEC N.º: 631)	GGCUUAACCCAGUGCACGUTT (ID SEC N.º: 1073)	ACGUGCACUGGGUUAAGCCTT (ID SEC N.º: 1515)	2,5

RAG3A-836	GAAGCCCCTGAGGACAGAG (ID SEC N.º: 632)	GAAGCCCCUGAGGACAGAGTT (ID SEC N.º: 1074)	CUCUGUCCUCAGGGGCUUCTT (ID SEC N.º: 1516)	2,4
RAG3A-569	CCCAGCAGACGAGCACCTA (ID SEC N.º: 633)	CCCAGCAGACGAGCACCUATT (ID SEC N.º: 1075)	UAGGUGCUCGUCUGCGGGTT (ID SEC N.º: 1517)	2,4
RAG3A-1320	CTCACTGCCTAGCCTGCCT (ID SEC N.º: 634)	CUCACUGCCUAGCCUGCCUTT (ID SEC N.º: 1076)	AGGCAGGCUAGGCAGUGAGTT (ID SEC N.º: 1518)	2,4
RAG3A-1319	TCACTGCCTAGCCTGCCTC (ID SEC N.º: 635)	UCACUGCCUAGCCUGCCUUTT (ID SEC N.º: 1077)	GAGGCAGGCUAGGCAGUGATT (ID SEC N.º: 1519)	2,3
RAG3A-290	GATAGCCAGGGAGTGAAAA (ID SEC N.º: 636)	GAUAGCCAGGGAGUGAAAATT (ID SEC N.º: 1078)	UUUUCACUCCCUGGCUAUCTT (ID SEC N.º: 1520)	2,3
RAG3A-1074	TGGTCATGCCTGCCTCCCT (ID SEC N.º: 637)	UGGUCAUGCCUGCCUCCUTT (ID SEC N.º: 1079)	AGGGAGGCAGGCAUGACCATT (ID SEC N.º: 1521)	2,2
RAG3A-279	AGTGAAAACCCACCAATC (ID SEC N.º: 638)	AGUGAAAACCCACCAAUCTT (ID SEC N.º: 1080)	GAUUGGUGGGGUUUUCACUTT (ID SEC N.º: 1522)	2,2
RAG3A-521	GCACATACATGTGCCCCGC (ID SEC N.º: 639)	GCACAUACAUGUGCCCCGCTT (ID SEC N.º: 1081)	GCGGGGCACAUGUAUGUGCTT (ID SEC N.º: 1523)	2,2
RAG3A-25	CTGGTGGCTCCCTTCTCTG (ID SEC N.º: 640)	CUGGUGGCUCUCCUUCUCUGTT (ID SEC N.º: 1082)	CAGAGAAGGGAGCCACCAGTT (ID SEC N.º: 1524)	2,1
RAG3A-62	AAGAGAAGGCGTCACTTCC (ID SEC N.º: 641)	AAGAGAAGGCGUCACUUCCTT (ID SEC N.º: 1083)	GGAAGUGACGCCUUCUCUUTT (ID SEC N.º: 1525)	2,1
RAG3A-852	ATCAAGGTCAGGCCAGGAA (ID SEC N.º: 642)	AUCAAGGUCAGGCCAGGAATT (ID SEC N.º: 1084)	UUCUGGCCUGACCUUGAUTT (ID SEC N.º: 1526)	2,1
RAG3A-931	CTCAGCAGACATGCCCATC (ID SEC N.º: 643)	CUCAGCAGACAUGCCCAUCTT (ID SEC N.º: 1085)	GAUGGGCAUGUCUGCUGAGTT (ID SEC N.º: 1527)	2,1
RAG3A-892	GAGAGCCTGAGGAAGTTCT (ID SEC N.º: 644)	GAGAGCCUGAGGAAGUUCUTT (ID SEC N.º: 1086)	AGAACUUCCUCAGGCUCUCTT (ID SEC N.º: 1528)	2
RAG3A-235	CCCAGCAACACAAATGTCC (ID SEC N.º: 645)	CCCAGCAACACAAAUGUCCTT (ID SEC N.º: 1087)	GGACAUUUGUGUUGCUGGGTT (ID SEC N.º: 1529)	2
RAG3A-1246	TAGCCAGAAACCGGCAGCA (ID SEC N.º: 646)	UAGCCAGAAACCGGCAGCATT (ID SEC N.º: 1088)	UGCUGCCGGUUUCUGGCUATT (ID SEC N.º: 1530)	2

RAG3A-19	GCTCCCTTCTCTGATTGGG (ID SEC N.º: 647)	GCUCCCUUCUCUGAUUGGGTT (ID SEC N.º: 1089)	CCCAAUCAGAGAAGGGAGCTT (ID SEC N.º: 1531)	2
RAG3A-1322	CTCTCACTGCCTAGCCTGC (ID SEC N.º: 648)	CUCUCACUGCCUAGCCUGCTT (ID SEC N.º: 1090)	GCAGGCUAGGCAGUGAGAGTT (ID SEC N.º: 1532)	2
RAG3A-795	GAAGAAAGCAAAGGAGCTA (ID SEC N.º: 649)	GAAGAAAGCAAAGGAGCUATT (ID SEC N.º: 1091)	UAGCUCCUUUGCUUUCUUCTT (ID SEC N.º: 1533)	2
RAG3A-515	ACATGTGCCCCGCACCTGA (ID SEC N.º: 650)	ACAUGUGCCCCGCACCUGATT (ID SEC N.º: 1092)	UCAGGUGCGGGGCACAUGUTT (ID SEC N.º: 1534)	2
RAG3A-128	TCCAAATCTTCTCCGTGGT (ID SEC N.º: 651)	UCCAAAUCUUCUCCGUGGUTT (ID SEC N.º: 1093)	ACCACGGAGAAGAUUUGGATT (ID SEC N.º: 1535)	2
RAG3A-661	GGAACGGTAGGAGATGGAA (ID SEC N.º: 652)	GGAACGGUAGGAGAUGGAATT (ID SEC N.º: 1094)	UCCAUCUCCUACCGUUCCTT (ID SEC N.º: 1536)	2
RAG3A-125	AAATCTTCTCCGTGGTGTG (ID SEC N.º: 653)	AAAUCUUCUCCGUGGUGUGTT (ID SEC N.º: 1095)	CACACCACGGAGAAGAUUUTT (ID SEC N.º: 1537)	2
RAG3A-1241	AGAAACCGGCAGCATTTCCC (ID SEC N.º: 654)	AGAAACCGGCAGCAUUCCTT (ID SEC N.º: 1096)	GGGAAUGCUGCCGGUUUCUTT (ID SEC N.º: 1538)	2
RAG3A-463	TAACACCAACCCATAACAG (ID SEC N.º: 655)	UAACACCAACCCAUACAGTT (ID SEC N.º: 1097)	CUGUUAUGGGUUGGUGUUATT (ID SEC N.º: 1539)	2
RAG3A-434	TCATGTGGGCAATATCCGT (ID SEC N.º: 656)	UCAUGUGGGCAAUAUCCGUTT (ID SEC N.º: 1098)	ACGGAUAUUGCCCACAUGATT (ID SEC N.º: 1540)	1,9
RAG3A-520	CACATACATGTGCCCCGCA (ID SEC N.º: 657)	CACAUACAUGUGCCCCGCATT (ID SEC N.º: 1099)	UGCGGGGCACAUGUAUGUGTT (ID SEC N.º: 1541)	1,9
RAG3A-499	TGACAGTCCACTCAACCCG (ID SEC N.º: 658)	UGACAGUCCACUCAACCCGTT (ID SEC N.º: 1100)	CGGGUUGAGUGGACUGUCATT (ID SEC N.º: 1542)	1,9
RAG3A-668	CACATGTGGAACGGTAGGA (ID SEC N.º: 659)	CACAUGUGGAACGGUAGGATT (ID SEC N.º: 1101)	UCCUACCGUCCACAUGUGTT (ID SEC N.º: 1543)	1,9
RAG3A-591	GTAGCCATCTAAGCCACTG (ID SEC N.º: 660)	GUAGCCAUCUAAGCCACUGTT (ID SEC N.º: 1102)	CAGUGGCUUAGAUGGCUACTT (ID SEC N.º: 1544)	1,9
RAG3A-1209	GACAGTATCTCCCTCTCAT (ID SEC N.º: 661)	GACAGUAUCUCCUCUCAUTT (ID SEC N.º: 1103)	AUGAGAGGGAGAUACUGUCTT (ID SEC N.º: 1545)	1,9

RAG3A-1257	GGACAGGGACCTAGCCAGA (ID SEC N.º: 662)	GGACAGGGACCUAGCCAGATT (ID SEC N.º: 1104)	UCUGGCUAGGUCCCUGUCCTT (ID SEC N.º: 1546)	1,9
RAG3A-1170	ATTCGACAGTCCCCTCTTG (ID SEC N.º: 663)	AUUCGACAGUCCCCUCUUGTT (ID SEC N.º: 1105)	CAAGAGGGGACUGUCGAAUTT (ID SEC N.º: 1547)	1,9
RAG3A-39	GCCTTCACCAAGTGTCTGGT (ID SEC N.º: 664)	GCCUUCACCAGUGUCUGGUTT (ID SEC N.º: 1106)	ACCAGACACUGGUGAAGGCTT (ID SEC N.º: 1548)	1,9
RAG3A-431	TGTGGGCAATATCCGTGTT (ID SEC N.º: 665)	UGUGGGCAAUAUCCGUGUUTT +B50 (ID SEC N.º: 1107)	AACACGGAUAUUGCCCACATT (ID SEC N.º: 1549)	1,9
RAG3A-1080	GTTCCCTGGTCATGCCTGC (ID SEC N.º: 666)	GUUCCUGGUCAUGCCUGCTT (ID SEC N.º: 1108)	GCAGGCAUGACCAGGGAACTT (ID SEC N.º: 1550)	1,9
RAG3A-1266	TGTTACCCAGGACAGGGAC (ID SEC N.º: 667)	UGUUACCCAGGACAGGGACTT (ID SEC N.º: 1109)	GUCCCUGUCCUGGGUAACTT (ID SEC N.º: 1551)	1,9
RAG3A-1202	TCTCCCTCTCATTGTA ACT (ID SEC N.º: 668)	UCUCCUCUCAUUGUAACTT (ID SEC N.º: 1110)	AGUUACAAUGAGAGGGAGATT (ID SEC N.º: 1552)	1,9
RAG3A-979	ACATCTCGTCTGGCTGGAC (ID SEC N.º: 669)	ACAUCUCGUCUGGCUGGACTT (ID SEC N.º: 1111)	GUCCAGCCAGACGAGAUGUTT (ID SEC N.º: 1553)	1,9
RAG3A-343	AGCATCCTGTTGGATTTC A (ID SEC N.º: 670)	AGCAUCCUGUUGGAUUUCATT (ID SEC N.º: 1112)	UGAAAUCCAACAGGAUGCUTT (ID SEC N.º: 1554)	1,9
RAG3A-430	GTGGGCAATATCCGTGTTC (ID SEC N.º: 671)	GUGGGCAAUAUCCGUGUUCTT (ID SEC N.º: 1113)	GAACACGGAUAUUGCCCCTT (ID SEC N.º: 1555)	1,9
RAG3A-319	AGGTATGATGTCCAGGGAA (ID SEC N.º: 672)	AGGUAUGAUGUCCAGGGAATT (ID SEC N.º: 1114)	UUCCCUGGACAUCAUACCTT (ID SEC N.º: 1556)	1,8
RAG3A-612	TGGGCACAGAGGTCTGTGT (ID SEC N.º: 673)	UGGGCACAGAGGUCUGUGUTT (ID SEC N.º: 1115)	ACACAGACCUCUGUGCCCATT (ID SEC N.º: 1557)	1,8
RAG3A-454	CCCATAACAGGAGATTTCT (ID SEC N.º: 674)	CCCAUAACAGGAGAUUUCUTT (ID SEC N.º: 1116)	AGAAAUCUCCUGUUAUGGGTT (ID SEC N.º: 1558)	1,8
RAG3A-1312	CTAGCCTGCCTCCCTACCT (ID SEC N.º: 675)	CUAGCCUGCCUCCCUACCTT (ID SEC N.º: 1117)	AGGUAGGGAGGCAGGCUAGTT (ID SEC N.º: 1559)	1,8
RAG3A-342	GCATCCTGTTGGATTTCAG (ID SEC N.º: 676)	GCAUCCUGUUGGAUUUCAGTT (ID SEC N.º: 1118)	CUGAAAUCCAACAGGAUGCTT (ID SEC N.º: 1560)	1,8

RAG3A-1118	TCTGCCTCTCCAGCCCACT (ID SEC N.º: 677)	UCUGCCUCUCCAGCCCACUTT (ID SEC N.º: 1119)	AGUGGGCUGGAGAGGCAGATT (ID SEC N.º: 1561)	1,8
RAG3A-970	CTGGCTGGACGGGAAAATT (ID SEC N.º: 678)	CUGGCUGGACGGGAAAATT (ID SEC N.º: 1120)	AAUUUCCCCGUCCAGCCAGTT (ID SEC N.º: 1562)	1,8
RAG3A-1133	TCACCCAAGGGACCCTCTG (ID SEC N.º: 679)	UCACCCAAGGGACCCUCUGTT (ID SEC N.º: 1121)	CAGAGGGUCCCUUGGGUGATT (ID SEC N.º: 1563)	1,8
RAG3A-689	GGGCCTGGTTATTCTCTT (ID SEC N.º: 680)	GGGCCUGGUUAUCCUCUUTT (ID SEC N.º: 1122)	AAGAGGAAUAACCAGGCCCTT (ID SEC N.º: 1564)	1,8
RAG3A-1321	TCTCACTGCCTAGCCTGCC (ID SEC N.º: 681)	UCUCACUGCCUAGCCUGCCTT (ID SEC N.º: 1123)	GGCAGGCUAGGCAGUGAGATT (ID SEC N.º: 1565)	1,8
RAG3A-662	TGGAACGGTAGGAGATGGA (ID SEC N.º: 682)	UGGAACGGUAGGAGAUGGATT (ID SEC N.º: 1124)	UCCAUCUCCUACCGUUCATT (ID SEC N.º: 1566)	1,8
RAG3A-817	ACTGTGGGGAGACTGGGAC (ID SEC N.º: 683)	ACUGUGGGGAGACUGGGACTT (ID SEC N.º: 1125)	GUCCCAGUCUCCCCACAGUTT (ID SEC N.º: 1567)	1,8
RAG3A-1242	CAGAAACCGGCAGCATTCC (ID SEC N.º: 684)	CAGAAACCGGCAGCAUUCCTT (ID SEC N.º: 1126)	GGAAUGCUGCCGGUUUCUGTT (ID SEC N.º: 1568)	1,8
RAG3A-278	GTGAAAACCCACCAATCT (ID SEC N.º: 685)	GUGAAAACCCACCAAUCUTT (ID SEC N.º: 1127)	AGAUUGGUGGGGUUUUUCTT (ID SEC N.º: 1569)	1,8
RAG3A-1210	TGACAGTATCTCCCTCTCA (ID SEC N.º: 686)	UGACAGUAUCUCCUCUCATT (ID SEC N.º: 1128)	UGAGAGGGAGAUACUGUCATT (ID SEC N.º: 1570)	1,8
RAG3A-1084	CTTGTTCCCTGGTCATGC (ID SEC N.º: 687)	CUUGGUUCCCUUGUCAUGCTT (ID SEC N.º: 1129)	GCAUGACCAGGGAACCAAGTT (ID SEC N.º: 1571)	1,8
RAG3A-1166	GACAGTCCCCTCTTGCTTT (ID SEC N.º: 688)	GACAGUCCCCUCUUGCUUUTT (ID SEC N.º: 1130)	AAAGCAAGAGGGGACUGUCTT (ID SEC N.º: 1572)	1,8
RAG3A-982	GAGACATCTCGTCTGGCTG (ID SEC N.º: 689)	GAGACAUCUCGUCUGGCUGTT (ID SEC N.º: 1131)	CAGCCAGACGAGAUGUCUCTT (ID SEC N.º: 1573)	1,8
RAG3A-171	AGGTCCCAGGTTGCCCATG (ID SEC N.º: 690)	AGGUCCCAGGUUGCCCAUGTT (ID SEC N.º: 1132)	CAUGGGCAACCUGGGACCUTT (ID SEC N.º: 1574)	1,8
RAG3A-256	ACAAGACCTCTGTGCTTCT (ID SEC N.º: 691)	ACAAGACCUCUGUGCUUCUTT (ID SEC N.º: 1133)	AGAAGCACAGAGGUCUUGUTT (ID SEC N.º: 1575)	1,7

RAG3A-563	AGACGAGCACCTAAGCTCA (ID SEC N.º: 692)	AGACGAGCACCUAAGCUCATT (ID SEC N.º: 1134)	UGAGCUUAGGUGCUCGUCUTT (ID SEC N.º: 1576)	1,7
RAG3A-1176	AGGCGCATTTCGACAGTCCC (ID SEC N.º: 693)	AGGCGCAUUCGACAGUCCCTT (ID SEC N.º: 1135)	GGGACUGUCGAAUGCGCCUTT (ID SEC N.º: 1577)	1,7
RAG3A-707	CCTAAGACAGGGACACATG (ID SEC N.º: 694)	CCUAAGACAGGGACACAUGTT (ID SEC N.º: 1136)	CAUGUGUCCCUGUCUUAGGTT (ID SEC N.º: 1578)	1,7
RAG3A-561	ACGAGCACCTAAGCTCAGG (ID SEC N.º: 695)	ACGAGCACCUAAGCUCAGGTT (ID SEC N.º: 1137)	CCUGAGCUUAGGUGCUCGUTT (ID SEC N.º: 1579)	1,7
RAG3A-504	GCACCTGACAGTCCACTCA (ID SEC N.º: 696)	GCACCUGACAGUCCACUCATT (ID SEC N.º: 1138)	UGAGUGGACUGUCAGGUGCTT (ID SEC N.º: 1580)	1,7
RAG3A-195	AAACTTCTGCTCCTGTCCC (ID SEC N.º: 697)	AAACUUCUGCUCCUGUCCCTT (ID SEC N.º: 1139)	GGGACAGGAGCAGAAGUUUTT (ID SEC N.º: 1581)	1,7
RAG3A-850	CAAGGTCAGGCCAGGAAGC (ID SEC N.º: 698)	CAAGGUCAGGCCAGGAAGCTT (ID SEC N.º: 1140)	GCUUCCUGGCCUGACCUUGTT (ID SEC N.º: 1582)	1,7
RAG3A-388	AGATAGGACTCCCTAGGGG (ID SEC N.º: 699)	AGAUAGGACUCCCUAGGGGTT (ID SEC N.º: 1141)	CCCCUAGGGAGUCCUAUCUTT (ID SEC N.º: 1583)	1,7
RAG3A-1079	TTCCCTGGTCATGCCTGCC (ID SEC N.º: 700)	UUCCCUGGUCAUGCCUGCCTT (ID SEC N.º: 1142)	GGCAGGCAUGACCAGGGAATT (ID SEC N.º: 1584)	1,7
RAG3A-1263	TACCCAGGACAGGGACCTA (ID SEC N.º: 701)	UACCCAGGACAGGGACCUATT (ID SEC N.º: 1143)	UAGGUCCCUGUCCUGGGUATT (ID SEC N.º: 1585)	1,7
RAG3A-531	GCACGTGTGCGCACATACA (ID SEC N.º: 702)	GCACGUGUGCGCACAUACATT (ID SEC N.º: 1144)	UGUAUGUGCGCACACGUGCTT (ID SEC N.º: 1586)	1,7
RAG3A-254	AAGACCTCTGTGCTTCTTC (ID SEC N.º: 703)	AAGACCUCUGUGCUUCUUCTT (ID SEC N.º: 1145)	GAAGAAGCACAGAGGUCUUTT (ID SEC N.º: 1587)	1,7
RAG3A-421	ATCCGTGTTCCCACTTCGA (ID SEC N.º: 704)	AUCCGUGUCCCACUUCGATT (ID SEC N.º: 1146)	UCGAAGUGGGAACACGGAUTT (ID SEC N.º: 1588)	1,7
RAG3A-473	CCTTTCCCCATAACACCAA (ID SEC N.º: 705)	CCUUUCCCCAUAAACACCAATT (ID SEC N.º: 1147)	UUGGUGUUAUGGGGAAAGGTT (ID SEC N.º: 1589)	1,7
RAG3A-292	TGGATAGCCAGGGAGTGAA (ID SEC N.º: 706)	UGGAUAGCCAGGGAGUGAATT (ID SEC N.º: 1148)	UUCACUCCCUGGCUAUCCATT (ID SEC N.º: 1590)	1,7

RAG3A-283	AGGGAGTGAAAACCCCACC (ID SEC N.º: 707)	AGGGAGUGAAAACCCCACCTT (ID SEC N.º: 1149)	GGUGGGGUUUUCACUCCCTT (ID SEC N.º: 1591)	1,7
RAG3A-786	AAAGGAGCTAGAGCCAGGG (ID SEC N.º: 708)	AAAGGAGCUAGAGCCAGGGTT (ID SEC N.º: 1150)	CCCUGGCUCUAGCUCCUUTT (ID SEC N.º: 1592)	1,7
RAG3A-582	TAAGCCACTGGACCCCAGC (ID SEC N.º: 709)	UAAGCCACUGGACCCCAGCTT (ID SEC N.º: 1151)	GCUGGGGUCCAGUGGCUUATT (ID SEC N.º: 1593)	1,7
RAG3A-933	TTCTCAGCAGACATGCCCA (ID SEC N.º: 710)	UUCUCAGCAGACAUGCCCATT (ID SEC N.º: 1152)	UGGGCAUGUCUGCUGAGAATT (ID SEC N.º: 1594)	1,7
RAG3A-472	CTTTCCCCATAACACCAAC (ID SEC N.º: 711)	CUUUCCCCAUAACACCAACTT (ID SEC N.º: 1153)	GUUGGUGUUAUGGGGAAAGTT (ID SEC N.º: 1595)	1,7
RAG3A-646	GGAAGACGGAGACAGAACA (ID SEC N.º: 712)	GGAAGACGGAGACAGAACATT (ID SEC N.º: 1154)	UGUUCUGUCUCCGUCUUCCTT (ID SEC N.º: 1596)	1,6
RAG3A-389	AAGATAGGACTCCCTAGGG (ID SEC N.º: 713)	AAGAUAGGACUCCCUAGGGTT (ID SEC N.º: 1155)	CCCUAGGGAGUCCUAUCUUTT (ID SEC N.º: 1597)	1,6
RAG3A-971	TCTGGCTGGACGGGAAAAT (ID SEC N.º: 714)	UCUGGCUGGACGGGAAAATT (ID SEC N.º: 1156)	AUUUUCUCCGUCCAGCCAGATT (ID SEC N.º: 1598)	1,6
RAG3A-751	GCCAGCAGGGAGGTATTTG (ID SEC N.º: 715)	GCCAGCAGGGAGGUUUUUGTT (ID SEC N.º: 1157)	CAAAUACCUCCUGCUGGCTT (ID SEC N.º: 1599)	1,6
RAG3A-299	AGAAATTTGGATAGCCAGG (ID SEC N.º: 716)	AGAAAUUUGGAUAGCCAGGTT (ID SEC N.º: 1158)	CCUGGCUAUCCAAAUUUCUTT (ID SEC N.º: 1600)	1,6
RAG3A-750	CCAGCAGGGAGGTATTTGC (ID SEC N.º: 717)	CCAGCAGGGAGGUUUUUGCTT (ID SEC N.º: 1159)	GCAAAUACCUCCUGCUGGTT (ID SEC N.º: 1601)	1,6
RAG3A-671	TGTCACATGTGGAACGGTA (ID SEC N.º: 718)	UGUCACAUGUGGAACGGUATT (ID SEC N.º: 1160)	UACCGUCCACAUGUGACATT (ID SEC N.º: 1602)	1,6
RAG3A-749	CAGCAGGGAGGTATTTGCG (ID SEC N.º: 719)	CAGCAGGGAGGUUUUUGCGTT (ID SEC N.º: 1161)	CGCAAUACCUCCUGCUGTT (ID SEC N.º: 1603)	1,6
RAG3A-547	TCAGGCTTAACCCAGTGCA (ID SEC N.º: 720)	UCAGGCUUAACCCAGUGCATT (ID SEC N.º: 1162)	UGCACUGGGUUAAGCCUGATT (ID SEC N.º: 1604)	1,6
RAG3A-655	GTAGGAGATGGAAGACGGA (ID SEC N.º: 721)	GUAGGAGAUGGAAGACGGATT (ID SEC N.º: 1163)	UCCGUCUCCAUCUCCUACTT (ID SEC N.º: 1605)	1,6

RAG3A-170	GGTCCCAGGTTGCCCATGT (ID SEC N.º: 722)	GGUCCCAGGUUGCCCAUGUTT (ID SEC N.º: 1164)	ACAUGGGCAACCUGGGACCTT (ID SEC N.º: 1606)	1,6
RAG3A-629	CAAGCAAAGGAGGGCCCTG (ID SEC N.º: 723)	CAAGCAAAGGAGGGCCUGTT (ID SEC N.º: 1165)	CAGGGCCCUCCUUUGCUUGTT (ID SEC N.º: 1607)	1,6
RAG3A-253	AGACCTCTGTGCTTCTTCC (ID SEC N.º: 724)	AGACCUCUGUGCUUCUUCCTT (ID SEC N.º: 1166)	GGAAGAAGCACAGAGGUCUTT (ID SEC N.º: 1608)	1,6
RAG3A-695	ACACATGGGCCTGGTTATT (ID SEC N.º: 725)	ACACAUGGGCCUGGUUAUUTT (ID SEC N.º: 1167)	AAUAACCAGGCCCAUGUGUTT (ID SEC N.º: 1609)	1,6
RAG3A-788	GCAAAGGAGCTAGAGCCAG (ID SEC N.º: 726)	GCAAAGGAGCUAGAGCCAGTT (ID SEC N.º: 1168)	CUGGCUCUAGCUCCUUUGCTT (ID SEC N.º: 1610)	1,6
RAG3A-688	GGCCTGGTTATTCCTCTTG (ID SEC N.º: 727)	GGCCUGGUUAUUCUCUUGTT (ID SEC N.º: 1169)	CAAGAGGAAUAACCAGGCCTT (ID SEC N.º: 1611)	1,6
RAG3A-728	GGAGGTCCAGCAGCTGTCT (ID SEC N.º: 728)	GGAGGUCCAGCAGCUGUCUTT (ID SEC N.º: 1170)	AGACAGCUGCUGGACCUCCTT (ID SEC N.º: 1612)	1,6
RAG3A-519	ACATACATGTGCCCCGCAC (ID SEC N.º: 729)	ACAUACAUGUGCCCCGCACTT (ID SEC N.º: 1171)	GUGCGGGGCACAUGUAUGUTT (ID SEC N.º: 1613)	1,6
RAG3A-272	ACCCACCAATCTTAAACA (ID SEC N.º: 730)	ACCCACCAAUCUUAACATT (ID SEC N.º: 1172)	UGUUUAAGAUUGGUGGGGUTT (ID SEC N.º: 1614)	1,6
RAG3A-318	GGTATGATGTCCAGGGAAA (ID SEC N.º: 731)	GGUAUGAUGUCCAGGGAAATT (ID SEC N.º: 1173)	UUUCCUGGACAUCAUACCTT (ID SEC N.º: 1615)	1,6
RAG3A-1338	AAACCCTCACCACTCTC (ID SEC N.º: 732)	AAACCUCACCACTCUCTT (ID SEC N.º: 1174)	GAGAGGGUGGUGAGGGUUTT (ID SEC N.º: 1616)	1,6
RAG3A-539	AACCCAGTGCACGTGTGCG (ID SEC N.º: 733)	AACCCAGUGCACGUGUGCGTT (ID SEC N.º: 1175)	CGCACACGUGCACUGGGUUTT (ID SEC N.º: 1617)	1,6
RAG3A-826	AGGACAGAGACTGTGGGGA (ID SEC N.º: 734)	AGGACAGAGACUGUGGGGATT (ID SEC N.º: 1176)	UCCCCACAGUCUCUGUCCUTT (ID SEC N.º: 1618)	1,6
RAG3A-337	CTGTTGGATTTTCAGCAGCA (ID SEC N.º: 735)	CUGUUGGAUUUCAGCAGCATT (ID SEC N.º: 1177)	UGCUGCUGAAAUCCAACAGTT (ID SEC N.º: 1619)	1,6
RAG3A-273	AACCCACCAATCTTAAAC (ID SEC N.º: 736)	AACCCACCAAUCUUAACCTT (ID SEC N.º: 1178)	GUUUAAGAUUGGUGGGGUUTT (ID SEC N.º: 1620)	1,6

RAG3A-478	CAAACCCCTTTCCCCATAAC (ID SEC N.º: 737)	CAAACCCUUUCCCCAUAACTT (ID SEC N.º: 1179)	GUUAUGGGGAAAGGGUUUGTT (ID SEC N.º: 1621)	1,6
RAG3A-963	GACGGGAAAATTCCAGGAT (ID SEC N.º: 738)	GACGGGAAA AUCCAGGAUTT (ID SEC N.º: 1180)	AUCCUGGAAUUUCCCCGUCTT (ID SEC N.º: 1622)	1,6
RAG3A-248	TCTGTGCTTCTTCCCCAGC (ID SEC N.º: 739)	UCUGUGCUUCUCCCCAGCTT (ID SEC N.º: 1181)	GCUGGGGAAGAAGCACAGATT (ID SEC N.º: 1623)	1,6
RAG3A-35	TCACCAGTGTCTGGTGGCT (ID SEC N.º: 740)	UCACCAGUGUCUGGUGGCUTT (ID SEC N.º: 1182)	AGCCACCAGACACUGGUGATT (ID SEC N.º: 1624)	1,5
RAG3A-613	CTGGGCACAGAGGTCTGTG (ID SEC N.º: 741)	CUGGGCACAGAGGUCUGUGTT (ID SEC N.º: 1183)	CACAGACCUCUGUGCCCAGTT (ID SEC N.º: 1625)	1,5
RAG3A-1141	CCCTTCCTTCACCCAAGGG (ID SEC N.º: 742)	CCCUUCCUUCACCCAAGGGTT (ID SEC N.º: 1184)	CCCUUGGGUGAAGGAAGGGTT (ID SEC N.º: 1626)	1,5
RAG3A-477	AAACCCCTTTCCCCATAACA (ID SEC N.º: 743)	AAACCCUUUCCCCAUAACTT (ID SEC N.º: 1185)	UGUUAUGGGGAAAGGGUUUTT (ID SEC N.º: 1627)	1,5
RAG3A-634	CAGAACAAGCAAAGGAGGG (ID SEC N.º: 744)	CAGAACAAGCAAAGGAGGGTT (ID SEC N.º: 1186)	CCCUCCUUUGCUUGUUCUGTT (ID SEC N.º: 1628)	1,5
RAG3A-1280	GCTCCTCATTCTTGTGTTA (ID SEC N.º: 745)	GUCCUCAUUCUUGUGUUATT (ID SEC N.º: 1187)	UAACACAAGAAUGAGGAGCTT (ID SEC N.º: 1629)	1,5
RAG3A-1062	CCTCCCTGTCTCCTGTCTC (ID SEC N.º: 746)	CCUCCCUGUCUCCUGUCUCTT (ID SEC N.º: 1188)	GAGACAGGAGACAGGGAGGTT (ID SEC N.º: 1630)	1,5
RAG3A-778	TAGAGCCAGGGCCAAAGGA (ID SEC N.º: 747)	UAGAGCCAGGGCCAAAGGATT (ID SEC N.º: 1189)	UCCUUUGGCCCUUGGCUCUATT (ID SEC N.º: 1631)	1,5
RAG3A-939	CCACACTTCTCAGCAGACA (ID SEC N.º: 748)	CCACACUUCUCAGCAGACATT (ID SEC N.º: 1190)	UGUCUGCUGAGAAGUGUGGTT (ID SEC N.º: 1632)	1,5
RAG3A-779	CTAGAGCCAGGGCCAAAGG (ID SEC N.º: 749)	CUAGAGCCAGGGCCAAAGGTT (ID SEC N.º: 1191)	CCUUUGGCCCUUGGCUCUAGTT (ID SEC N.º: 1633)	1,5
RAG3A-803	GGGACTGGGAAGAAAGCAA (ID SEC N.º: 750)	GGGACUGGGAAGAAAGCAATT (ID SEC N.º: 1192)	UUGC UUUCUCCCCAGUCCCTT (ID SEC N.º: 1634)	1,5
RAG3A-1382	GTCCATCAGCCGATCTCCC (ID SEC N.º: 751)	GUCCAUCAGCCGAUCUCCCTT (ID SEC N.º: 1193)	GGGAGAUCGGCUGAUGGACTT (ID SEC N.º: 1635)	1,5

RAG3A-97	AGGAGTGGACCCTGGTCCA (ID SEC N.º: 752)	AGGAGUGGACCCUGGUCCATT (ID SEC N.º: 1194)	UGGACCAGGGUCCACUCCUTT (ID SEC N.º: 1636)	1,5
RAG3A-543	GCTTAACCCAGTGCACGTG (ID SEC N.º: 753)	GCUUAACCCAGUGCACGUGTT (ID SEC N.º: 1195)	CACGUGCACUGGGUUAAGCTT (ID SEC N.º: 1637)	1,5
RAG3A-556	CACCTAAGCTCAGGCTTAA (ID SEC N.º: 754)	CACCUAAGCUCAGGCUUAATT (ID SEC N.º: 1196)	UUAAGCCUGAGCUUAGGUGTT (ID SEC N.º: 1638)	1,5
RAG3A-60	GAGAAGGCGTCACTTCCGG (ID SEC N.º: 755)	GAGAAGGCGUCACUUCGGTT (ID SEC N.º: 1197)	CCGGAAGUGACGCCUUCUCTT (ID SEC N.º: 1639)	1,5
RAG3A-647	TGGAAGACGGAGACAGAAC (ID SEC N.º: 756)	UGGAAGACGGAGACAGAACTT (ID SEC N.º: 1198)	GUUCUGUCUCCGUCUCCATT (ID SEC N.º: 1640)	1,5
RAG3A-243	GCTTCTTCCCCAGCAACAC (ID SEC N.º: 757)	GCUUCUCCCCAGCAAACTT (ID SEC N.º: 1199)	GUGUUGCUGGGGAAGAAGCTT (ID SEC N.º: 1641)	1,5
RAG3A-533	GTGCACGTGTGCGCACATA (ID SEC N.º: 758)	GUGCACGUGUGCGCACAUATT (ID SEC N.º: 1200)	UAUGUGCGCACACGUGCACTT (ID SEC N.º: 1642)	1,5
RAG3A-628	AAGCAAAGGAGGGCCCTGG (ID SEC N.º: 759)	AAGCAAAGGAGGGCCUGGTT (ID SEC N.º: 1201)	CCAGGGCCCUCCUUGCUUTT (ID SEC N.º: 1643)	1,5
RAG3A-849	AAGGTCAGGCCAGGAAGCC (ID SEC N.º: 760)	AAGGUCAGGCCAGGAAGCCTT (ID SEC N.º: 1202)	GGCUUCCUGGCCUGACCUUTT (ID SEC N.º: 1644)	1,5
RAG3A-1307	CTGCCTCCCTACCTTCTCT (ID SEC N.º: 761)	CUGCCUCCCUACCUUCUCUTT (ID SEC N.º: 1203)	AGAGAAGGUAGGGAGGCAGTT (ID SEC N.º: 1645)	1,5
RAG3A-293	TTGGATAGCCAGGGAGTGA (ID SEC N.º: 762)	UUGGAUAGCCAGGGAGUGATT (ID SEC N.º: 1204)	UCACUCCUGGCUAUCCAATT (ID SEC N.º: 1646)	1,5
RAG3A-1285	AGGTCGCTCCTCATTCTTG (ID SEC N.º: 763)	AGGUCGCUCCUCAUUCUUGTT (ID SEC N.º: 1205)	CAAGAAUGAGGAGCGACCUTT (ID SEC N.º: 1647)	1,5
RAG3A-1223	CCCTTCTGTGGAGTGACAG (ID SEC N.º: 764)	CCCUUCUGUGGAGUGACAGTT (ID SEC N.º: 1206)	CUGUCACUCCACAGAAGGGTT (ID SEC N.º: 1648)	1,5
RAG3A-1177	CAGGCGCATTCGACAGTCC (ID SEC N.º: 765)	CAGGCGCAUUCGACAGUCCTT (ID SEC N.º: 1207)	GGACUGUCGAAUGCGCCUGTT (ID SEC N.º: 1649)	1,5
RAG3A-226	ACAAATGTCCTGCCAGATT (ID SEC N.º: 766)	ACAAAUGUCCUGCCAGAUUTT (ID SEC N.º: 1208)	AAUCUGGCAGGACAUUUGUTT (ID SEC N.º: 1650)	1,5

RAG3A-1097	CAGCCTCCTTTCTCTTGGT (ID SEC N.º: 767)	CAGCCUCCUUUCUCUUGGUTT (ID SEC N.º: 1209)	ACCAAGAGAAAGGAGGCUGTT (ID SEC N.º: 1651)	1,5
RAG3A-1188	TAACCTTATCCTCAGGCGCA (ID SEC N.º: 768)	UAACUUAUCCUCAGGCGCATT (ID SEC N.º: 1210)	UGCGCCUGAGGAUAAGUUATT (ID SEC N.º: 1652)	1,5
RAG3A-593	GTGTAGCCATCTAAGCCAC (ID SEC N.º: 769)	GUGUAGCCAUCUAAGCCACTT (ID SEC N.º: 1211)	GUGGCUUAGAUGGCUAACTT (ID SEC N.º: 1653)	1,5
RAG3A-670	GTCACATGTGGAACGGTAG (ID SEC N.º: 770)	GUCACAUGUGGAACGGUAGTT (ID SEC N.º: 1212)	CUACCGUCCACAUGUGACTT (ID SEC N.º: 1654)	1,5
RAG3A-503	CACCTGACAGTCCACTCAA (ID SEC N.º: 771)	CACCUGACAGUCCACUCAATT (ID SEC N.º: 1213)	UUGAGUGGACUGUCAGGUGTT (ID SEC N.º: 1655)	1,5
RAG3A-1167	CGACAGTCCCCTCTTGCTT (ID SEC N.º: 772)	CGACAGUCCCCUCUUGCUUTT (ID SEC N.º: 1214)	AAGCAAGAGGGGACUGUCGTT (ID SEC N.º: 1656)	1,5
RAG3A-583	CTAAGCCACTGGACCCCAG (ID SEC N.º: 773)	CUAAGCCACUGGACCCCAGTT (ID SEC N.º: 1215)	CUGGGGUCCAGUGGCUUAGTT (ID SEC N.º: 1657)	1,5
RAG3A-706	CTAAGACAGGGACACATGG (ID SEC N.º: 774)	CUAAGACAGGGACACAUGGTT (ID SEC N.º: 1216)	CCAUGUGUCCUGUCUUAGTT (ID SEC N.º: 1658)	1,5
RAG3A-983	GGAGACATCTCGTCTGGCT (ID SEC N.º: 775)	GGAGACAUCUCGUCUGGCUTT (ID SEC N.º: 1217)	AGCCAGACGAGAUGUCUCCTT (ID SEC N.º: 1659)	1,5
RAG3A-718	CAGCTGTCTTTCCTAAGAC (ID SEC N.º: 776)	CAGCUGUCUUUCCUAAGACTT (ID SEC N.º: 1218)	GUCUUAGGAAAGACAGCUGTT (ID SEC N.º: 1660)	1,5
RAG3A-378	CCCTAGGGGATTACAGAAA (ID SEC N.º: 777)	CCCUAGGGGAUUACAGAAATT (ID SEC N.º: 1219)	UUUCUGUAAUCCCCUAGGGTT (ID SEC N.º: 1661)	1,5
RAG3A-1095	GCCTCCTTTCTCTTGGTTC (ID SEC N.º: 778)	GCCUCCUUUCUCUUGGUUCTT (ID SEC N.º: 1220)	GAACCAAGAGAAAGGAGGCTT (ID SEC N.º: 1662)	1,4
RAG3A-698	GGGACACATGGGCCTGGTT (ID SEC N.º: 779)	GGGACACAUGGGCCUGGUUTT (ID SEC N.º: 1221)	AACCAGGCCCAUGUGUCCCTT (ID SEC N.º: 1663)	1,4
RAG3A-277	TGAAAACCCACCAATCTT (ID SEC N.º: 780)	UGAAAACCCACCAAUUCUUTT (ID SEC N.º: 1222)	AAGAUUGGUGGGGUUUUCATT (ID SEC N.º: 1664)	1,4
RAG3A-644	AAGACGGAGACAGAACAAG (ID SEC N.º: 781)	AAGACGGAGACAGAACAAGTT (ID SEC N.º: 1223)	CUUGUUCUGUCUCCGUCUUTT (ID SEC N.º: 1665)	1,4

RAG3A-941	GGCCACACTTCTCAGCAGA (ID SEC N.º: 782)	GGCCACACUUCUCAGCAGATT (ID SEC N.º: 1224)	UCUGCUGAGAAGUGUGGCCTT (ID SEC N.º: 1666)	1,4
RAG3A-794	AAGAAAGCAAAGGAGCTAG (ID SEC N.º: 783)	AAGAAAGCAAAGGAGCUAGTT (ID SEC N.º: 1225)	CUAGCUCCUUUGCUUUCUUTT (ID SEC N.º: 1667)	1,4
RAG3A-890	GAGCCTGAGGAAGTTCTGG (ID SEC N.º: 784)	GAGCCUGAGGAAGUUCUGGTT (ID SEC N.º: 1226)	CCAGAACUCCUCAGGCUCTT (ID SEC N.º: 1668)	1,4
RAG3A-1310	AGCCTGCCTCCCTACCTTC (ID SEC N.º: 785)	AGCCUGCCUCCCUACCUUCTT (ID SEC N.º: 1227)	GAAGGUAGGGAGGCAGGCUTT (ID SEC N.º: 1669)	1,4
RAG3A-27	GTCTGGTGGCTCCCTTCTC (ID SEC N.º: 786)	GUCUGGUGGCUCCCUUCUUCTT (ID SEC N.º: 1228)	GAGAAGGGAGCCACCAGACTT (ID SEC N.º: 1670)	1,4
RAG3A-38	CCTTCACCAGTGTCTGGTG (ID SEC N.º: 787)	CCUUCACCAGUGUCUGGUGTT (ID SEC N.º: 1229)	CACCAGACACUGGUGAAGGTT (ID SEC N.º: 1671)	1,4
RAG3A-532	TGCACGTGTGCGCACATAC (ID SEC N.º: 788)	UGCACGUGUGCGCACAUACTT (ID SEC N.º: 1230)	GUAUGUGCGCACACGUGCATT (ID SEC N.º: 1672)	1,4
RAG3A-1023	TATCCTCCCAGCTATCCCA (ID SEC N.º: 789)	UAUCCUCCCAGCUAUCCCAT (ID SEC N.º: 1231)	UGGGAUAGCUGGGAGGAUATT (ID SEC N.º: 1673)	1,4
RAG3A-797	GGGAAGAAAGCAAAGGAGC (ID SEC N.º: 790)	GGGAAGAAAGCAAAGGAGCTT (ID SEC N.º: 1232)	GCUCCUUUGCUUUCUUCCTT (ID SEC N.º: 1674)	1,4
RAG3A-399	GGGGAATGACAAGATAGGA (ID SEC N.º: 791)	GGGGAUGACAAGAUAGGATT (ID SEC N.º: 1233)	UCCUAUCUUGUCAUUCCCCTT (ID SEC N.º: 1675)	1,4
RAG3A-945	TCTAGGCCACACTTCTCAG (ID SEC N.º: 792)	UCUAGGCCACACUUCUCAGTT (ID SEC N.º: 1234)	CUGAGAAGUGUGGCCUAGATT (ID SEC N.º: 1676)	1,4
RAG3A-344	AAGCATCCTGTTGGATTTC (ID SEC N.º: 793)	AAGCAUCCUGUUGGAUUUCTT (ID SEC N.º: 1235)	GAAAUCCAACAGGAUGCUUTT (ID SEC N.º: 1677)	1,4
RAG3A-1255	ACAGGGACCTAGCCAGAAA (ID SEC N.º: 794)	ACAGGGACCUAGCCAGAAATT (ID SEC N.º: 1236)	UUUCUGGCUAGGUCCCUGUTT (ID SEC N.º: 1678)	1,4
RAG3A-524	TGCGCACATACATGTGCCC (ID SEC N.º: 795)	UGCGCACAUACAUGUGCCCTT (ID SEC N.º: 1237)	GGGCACAUGUAUGUGCGCATT (ID SEC N.º: 1679)	1,4
RAG3A-244	TGCTTCTTCCCCAGCAACA (ID SEC N.º: 796)	UGCUUCUUCCCCAGCAACATT (ID SEC N.º: 1238)	UGUUGCUGGGGAAGAAGCATT (ID SEC N.º: 1680)	1,4

RAG3A-340	ATCCTGTTGGATTTCAGCA (ID SEC N.º: 797)	AUCCUGUUGGAUUUCAGCATT (ID SEC N.º: 1239)	UGCUGAAAUCCAACAGGAUTT (ID SEC N.º: 1681)	1,4
RAG3A-687	GCCTGGTTATTCTCTTGT (ID SEC N.º: 798)	GCCUGGUUAUCCUCUUGUTT (ID SEC N.º: 1240)	ACAAGAGGAAUAACCAGGCTT (ID SEC N.º: 1682)	1,4
RAG3A-568	CCAGCAGACGAGCACCTAA (ID SEC N.º: 799)	CCAGCAGACGAGCACCUAATT (ID SEC N.º: 1241)	UUAGGUGCUCGUCUGCUGGTT (ID SEC N.º: 1683)	1,4
RAG3A-804	TGGGACTGGGAAGAAAGCA (ID SEC N.º: 800)	UGGGACUGGGAAGAAAGCATT (ID SEC N.º: 1242)	UGCUUUCUUCCCAGUCCCATT (ID SEC N.º: 1684)	1,4
RAG3A-496	CAGTCCACTCAACCCGTCC (ID SEC N.º: 801)	CAGUCCACUCAACCCGUCCTT (ID SEC N.º: 1243)	GGACGGGUUGAGUGGACUGTT (ID SEC N.º: 1685)	1,4
RAG3A-810	GGAGACTGGGACTGGGAAG (ID SEC N.º: 802)	GGAGACUGGGACUGGGAAGTT (ID SEC N.º: 1244)	CUUCCCAGUCCCAGUCUCCTT (ID SEC N.º: 1686)	1,4
RAG3A-356	AAGCAGGAAAGCAAGCATC (ID SEC N.º: 803)	AAGCAGGAAAGCAAGCAUCTT (ID SEC N.º: 1245)	GAUGCUUGCUUCCUGCUUTT (ID SEC N.º: 1687)	1,4
RAG3A-1248	CCTAGCCAGAAACCGGCAG (ID SEC N.º: 804)	CCUAGCCAGAAACCGGCAGTT (ID SEC N.º: 1246)	CUGCCGGUUUCUGGCUAGGTT (ID SEC N.º: 1688)	1,4
RAG3A-1015	CAGCTATCCCAGCACCTC (ID SEC N.º: 805)	CAGCUAUCCCAGCACCCUCTT (ID SEC N.º: 1247)	GAGGGUGCUGGGAUAGCUGTT (ID SEC N.º: 1689)	1,4
RAG3A-645	GAAGACGGAGACAGAAACAA (ID SEC N.º: 806)	GAAGACGGAGACAGAAACAATT (ID SEC N.º: 1248)	UUGUUCUGUCUCCGUCUUCTT (ID SEC N.º: 1690)	1,4
RAG3A-517	ATACATGTGCCCCGCACCT (ID SEC N.º: 807)	AUACAUGUGCCCCGCACCUTT (ID SEC N.º: 1249)	AGGUGCGGGGCACAUGUAUTT (ID SEC N.º: 1691)	1,4
RAG3A-194	AACTTCTGCTCCTGTCCCC (ID SEC N.º: 808)	AACUUCUGCUCCUGUCCCCTT (ID SEC N.º: 1250)	GGGGACAGGAGCAGAAGUUTT (ID SEC N.º: 1692)	1,4
RAG3A-927	GCAGACATGCCCATCCTTG (ID SEC N.º: 809)	GCAGACAUGCCCAUCCUUGTT (ID SEC N.º: 1251)	CAAGGAUGGGCAUGUCUGCTT (ID SEC N.º: 1693)	1,4
RAG3A-271	CCCCACCAATCTTAAACAA (ID SEC N.º: 810)	CCCCACCAAUUCUAAACAATT (ID SEC N.º: 1252)	UUGUUUAAGAUUGGUGGGGTT (ID SEC N.º: 1694)	1,4
RAG3A-398	GGGAATGACAAGATAGGAC (ID SEC N.º: 811)	GGGAAUGACAAGAUAGGACTT (ID SEC N.º: 1253)	GUCCUAUCUUGUCAUUCCCTT (ID SEC N.º: 1695)	1,4

RAG3A-230	CAACACAAATGTCCTGCCA (ID SEC N.º: 812)	CAACACAAAUGUCCUGCCATT (ID SEC N.º: 1254)	UGGCAGGACAUUUGUGUUGTT (ID SEC N.º: 1696)	1,4
RAG3A-1104	CCACTCCCAGCCTCCTTTC (ID SEC N.º: 813)	CCACUCCCAGCCUCCUUUCTT (ID SEC N.º: 1255)	GAAAGGAGGCUGGGAGUGGTT (ID SEC N.º: 1697)	1,4
RAG3A-1254	CAGGGACCTAGCCAGAAAC (ID SEC N.º: 814)	CAGGGACCUAGCCAGAACTT (ID SEC N.º: 1256)	GUUUCUGGCUAGGUCCCUGTT (ID SEC N.º: 1698)	1,4
RAG3A-288	TAGCCAGGGAGTGAAAACC (ID SEC N.º: 815)	UAGCCAGGGAGUGAAAACCTT (ID SEC N.º: 1257)	GGUUUUCACUCCCUGGCUATT (ID SEC N.º: 1699)	1,4
RAG3A-837	GGAAGCCCCTGAGGACAGA (ID SEC N.º: 816)	GGAAGCCCCUGAGGACAGATT (ID SEC N.º: 1258)	UCUGUCCUCAGGGGCUUCCTT (ID SEC N.º: 1700)	1,4
RAG3A-935	ACTTCTCAGCAGACATGCC (ID SEC N.º: 817)	ACUUCUCAGCAGACAUGCCTT (ID SEC N.º: 1259)	GGCAUGUCUGCUGAGAAGUTT (ID SEC N.º: 1701)	1,4
RAG3A-476	AACCCTTTCCCCATAACAC (ID SEC N.º: 818)	AACCCUUUCCCCAUAACTT (ID SEC N.º: 1260)	GUGUUAUGGGGAAAGGGUUTT (ID SEC N.º: 1702)	1,4
RAG3A-589	AGCCATCTAAGCCACTGGA (ID SEC N.º: 819)	AGCCAUCUAAGCCACUGGATT (ID SEC N.º: 1261)	UCCAGUGGCUUAGAUGGCUTT (ID SEC N.º: 1703)	1,4
RAG3A-1207	CAGTATCTCCCTCTCATTG (ID SEC N.º: 820)	CAGUAUCUCCCUCUCAUUGTT (ID SEC N.º: 1262)	CAAUGAGAGGGAGAUACUGTT (ID SEC N.º: 1704)	1,4
RAG3A-1284	GGTCGCTCCTCATTCTTGT (ID SEC N.º: 821)	GGUCGCUCCUCAUUCUUGUTT (ID SEC N.º: 1263)	ACAAGAAUGAGGAGCGACCTT (ID SEC N.º: 1705)	1,4
RAG3A-956	AAATTCCAGGATCTAGGCC (ID SEC N.º: 822)	AAAUUCCAGGAUCUAGGCCTT (ID SEC N.º: 1264)	GGCCUAGAUCUGGAAUUUTT (ID SEC N.º: 1706)	1,4
RAG3A-557	GCACCTAAGCTCAGGCTTA (ID SEC N.º: 823)	GCACCUAAGCUCAGGCUUATT (ID SEC N.º: 1265)	UAAGCCUGAGCUUAGGUGCTT (ID SEC N.º: 1707)	1,4
RAG3A-500	CTGACAGTCCACTCAACCC (ID SEC N.º: 824)	CUGACAGUCCACUCAACCCTT (ID SEC N.º: 1266)	GGGUUGAGUGGACUGUCAGTT (ID SEC N.º: 1708)	1,4
RAG3A-1208	ACAGTATCTCCCTCTCATT (ID SEC N.º: 825)	ACAGUAUCUCCCUCUCAUUTT (ID SEC N.º: 1267)	AAUGAGAGGGAGAUACUGUTT (ID SEC N.º: 1709)	1,4
RAG3A-686	CCTGGTTATTCCTCTTGTC (ID SEC N.º: 826)	CCUGGUUAUCCUCUUGUCTT (ID SEC N.º: 1268)	GACAAGAGGAUAACCAGGTT (ID SEC N.º: 1710)	1,4

RAG3A-1168	TCGACAGTCCCCTCTTGCT (ID SEC N.º: 827)	UCGACAGUCCCCUCUUGCUTT (ID SEC N.º: 1269)	AGCAAGAGGGGACUGUCGATT (ID SEC N.º: 1711)	1,4
RAG3A-218	CCTGCCAGATTCCTCCTGG (ID SEC N.º: 828)	CCUGCCAGAUUCCUCCUGGTT (ID SEC N.º: 1270)	CCAGGAGGAAUCUGGCAGGTT (ID SEC N.º: 1712)	1,4
RAG3A-835	AAGCCCCTGAGGACAGAGA (ID SEC N.º: 829)	AAGCCCCUGAGGACAGAGATT (ID SEC N.º: 1271)	UCUCUGUCCUCAGGGGCUUTT (ID SEC N.º: 1713)	1,4
RAG3A-291	GGATAGCCAGGGAGTGAAA (ID SEC N.º: 830)	GGAUAGCCAGGGAGUGAAATT (ID SEC N.º: 1272)	UUUCACUCCUGGCUAUCCTT (ID SEC N.º: 1714)	1,3
RAG3A-1222	CCTTCTGTGGAGTGACAGT (ID SEC N.º: 831)	CCUUCUGUGGAGUGACAGUTT (ID SEC N.º: 1273)	ACUGUCACUCCACAGAAGGTT (ID SEC N.º: 1715)	1,3
RAG3A-276	GAAAACCCACCAATCTTA (ID SEC N.º: 832)	GAAAACCCACCAAUCUUATT (ID SEC N.º: 1274)	UAAGAUUGGUGGGGUUUUUCTT (ID SEC N.º: 1716)	1,3
RAG3A-156	CATGTCCAGGAAAAGATGG (ID SEC N.º: 833)	CAUGUCCAGGAAAAGAUGGTT (ID SEC N.º: 1275)	CCAUCUUUCCUGGACAUGTT (ID SEC N.º: 1717)	1,3
RAG3A-937	ACACTTCTCAGCAGACATG (ID SEC N.º: 834)	ACACUUCUCAGCAGACAUGTT (ID SEC N.º: 1276)	CAUGUCUGCUGAGAAGUGUTT (ID SEC N.º: 1718)	1,3
RAG3A-1262	ACCCAGGACAGGGACCTAG (ID SEC N.º: 835)	ACCCAGGACAGGGACCUAGTT (ID SEC N.º: 1277)	CUAGGUCCCUGUCCUGGGUTT (ID SEC N.º: 1719)	1,3
RAG3A-1139	CTTCCTTCACCCAAGGGAC (ID SEC N.º: 836)	CUUCCUUCACCCAAGGGACTT (ID SEC N.º: 1278)	GUCCCUUGGGUGAAGGAAGTT (ID SEC N.º: 1720)	1,3
RAG3A-535	CAGTGCACGTGTGCGCACA (ID SEC N.º: 837)	CAGUGCACGUGUGCGCACATT (ID SEC N.º: 1279)	UGUGCGCACACGUGCACUGTT (ID SEC N.º: 1721)	1,3
RAG3A-719	GCAGCTGTCTTTCCTAAGA (ID SEC N.º: 838)	GCAGCUGUCUUUCCUAAGATT (ID SEC N.º: 1280)	UCUUAGGAAAGACAGCUGCTT (ID SEC N.º: 1722)	1,3
RAG3A-726	AGGTCCAGCAGCTGTCTTT (ID SEC N.º: 839)	AGGUCCAGCAGCUGUCUUUTT (ID SEC N.º: 1281)	AAAGACAGCUGCUGGACCUTT (ID SEC N.º: 1723)	1,3
RAG3A-384	AGGACTCCCTAGGGGATTA (ID SEC N.º: 840)	AGGACUCCCUAGGGGAUUATT (ID SEC N.º: 1282)	UAAUCCCCUAGGGAGUCCUTT (ID SEC N.º: 1724)	1,3
RAG3A-834	AGCCCCTGAGGACAGAGAC (ID SEC N.º: 841)	AGCCCCUGAGGACAGAGACTT (ID SEC N.º: 1283)	GUCUCUGUCCUCAGGGGCUTT (ID SEC N.º: 1725)	1,3

RAG3A-562	GACGAGCACCTAAGCTCAG (ID SEC N.º: 842)	GACGAGCACCUAAGCUCAGTT (ID SEC N.º: 1284)	CUGAGCUUAGGUGCUCGUCTT (ID SEC N.º: 1726)	1,3
RAG3A-940	GCCACACTTCTCAGCAGAC (ID SEC N.º: 843)	GCCACACUUCUCAGCAGACTT (ID SEC N.º: 1285)	GUCUGCUGAGAAGUGUGGCTT (ID SEC N.º: 1727)	1,3
RAG3A-632	GAACAAGCAAAGGAGGGCC (ID SEC N.º: 844)	GAACAAGCAAAGGAGGGCCTT (ID SEC N.º: 1286)	GGCCCUCCUUUGCUUGUUCTT (ID SEC N.º: 1728)	1,3
RAG3A-746	CAGGGAGGTATTTGCGGGG (ID SEC N.º: 845)	CAGGGAGGUUUUGCGGGGTT (ID SEC N.º: 1287)	CCCCGCAAUACCUCUCCUGTT (ID SEC N.º: 1729)	1,3
RAG3A-1309	GCCTGCCTCCCTACCTTCT (ID SEC N.º: 846)	GCCUGCCUCCCUACCUUCUTT (ID SEC N.º: 1288)	AGAAGGUAGGGAGGCAGGCTT (ID SEC N.º: 1730)	1,3
RAG3A-780	GCTAGAGCCAGGGCCAAAG (ID SEC N.º: 847)	GCUAGAGCCAGGGCCAAAGTT (ID SEC N.º: 1289)	CUUUGGCCCUGGCUCUAGCTT (ID SEC N.º: 1731)	1,3
RAG3A-693	ACATGGGCCTGGTTATTCC (ID SEC N.º: 848)	ACAUGGGCCUGGUUAUUCCTT (ID SEC N.º: 1290)	GGAAUAACCAGGCCCAUGUTT (ID SEC N.º: 1732)	1,3
RAG3A-636	GACAGAACAAGCAAAGGAG (ID SEC N.º: 849)	GACAGAACAAGCAAAGGAGTT (ID SEC N.º: 1291)	CUCCUUUGCUUGUUCUGUCTT (ID SEC N.º: 1733)	1,3
RAG3A-258	AAACAAGACCTCTGTGCTT (ID SEC N.º: 850)	AAACAAGACCUCUGUGCUUTT (ID SEC N.º: 1292)	AAGCACAGAGGUCUUGUUUTT (ID SEC N.º: 1734)	1,3
RAG3A-1022	ATCCTCCCAGCTATCCCAG (ID SEC N.º: 851)	AUCCUCCCAGCUAUCCCAGTT (ID SEC N.º: 1293)	CUGGGAUAGCUGGGAGGAUTT (ID SEC N.º: 1735)	1,3
RAG3A-381	ACTCCCTAGGGGATTACAG (ID SEC N.º: 852)	ACUCCCUAGGGGAUUACAGTT (ID SEC N.º: 1294)	CUGUAAUCCCCUAGGGAGUTT (ID SEC N.º: 1736)	1,3
RAG3A-379	TCCCTAGGGGATTACAGAA (ID SEC N.º: 853)	UCCCUAGGGGAUUACAGAATT (ID SEC N.º: 1295)	UUCUGUAAUCCCCUAGGGATT (ID SEC N.º: 1737)	1,3
RAG3A-663	GTGGAACGGTAGGAGATGG (ID SEC N.º: 854)	GUGGAACGGUAGGAGAUGGTT (ID SEC N.º: 1296)	CCAUCUCCUACCGUCCACTT (ID SEC N.º: 1738)	1,3
RAG3A-1099	CCCAGCCTCCTTTCTCTTG (ID SEC N.º: 855)	CCCAGCCUCCUUUCUCUUGTT (ID SEC N.º: 1297)	CAAGAGAAAGGAGGCUGGGTT (ID SEC N.º: 1739)	1,3
RAG3A-855	GGGATCAAGGTCAGGCCAG (ID SEC N.º: 856)	GGGAUCAAGGUCAGGCCAGTT (ID SEC N.º: 1298)	CUGGCCUGACCUUGAUCCCTT (ID SEC N.º: 1740)	1,3

RAG3A-1279	CTCCTCATTCTTGTGTTAC (ID SEC N.º: 857)	CUCCUCAUUCUUGUGUUAUACTT (ID SEC N.º: 1299)	GUAACACAAGAAUGAGGAGTT (ID SEC N.º: 1741)	1,3
RAG3A-34	CACCAGTGTCTGGTGGCTC (ID SEC N.º: 858)	CACCAGUGUCUGGUGGCUCTT (ID SEC N.º: 1300)	GAGCCACCAGACACUGGUGTT (ID SEC N.º: 1742)	1,3
RAG3A-633	AGAACAAGCAAAGGAGGGC (ID SEC N.º: 859)	AGAACAAGCAAAGGAGGGCTT (ID SEC N.º: 1301)	GCCCUCCUUUGCUUGUUCUTT (ID SEC N.º: 1743)	1,3
RAG3A-453	CCATAACAGGAGATTTCTC (ID SEC N.º: 860)	CCAUAACAGGAGAUUUCUUCTT (ID SEC N.º: 1302)	GAGAAAUCUCCUGUUAUGGTT (ID SEC N.º: 1744)	1,3
RAG3A-246	TGTGCTTCTTCCCCAGCAA (ID SEC N.º: 861)	UGUGCUUCUUCCCCAGCAATT (ID SEC N.º: 1303)	UUGCUGGGGAAGAAGCACATT (ID SEC N.º: 1745)	1,3
RAG3A-592	TGTAGCCATCTAAGCCACT (ID SEC N.º: 862)	UGUAGCCAUCUAAGCCACUTT (ID SEC N.º: 1304)	AGUGGCUUAGAUGGCUACATT (ID SEC N.º: 1746)	1,3
RAG3A-270	CCCACCAATCTTAAACAAG (ID SEC N.º: 863)	CCCACCAAUCUUAACAAGTT (ID SEC N.º: 1305)	CUUGUUUAAGAUUGGUGGGTT (ID SEC N.º: 1747)	1,3
RAG3A-630	ACAAGCAAAGGAGGGCCCT (ID SEC N.º: 864)	ACAAGCAAAGGAGGGCCCTT (ID SEC N.º: 1306)	AGGGCCCUCCUUUGCUUGUTT (ID SEC N.º: 1748)	1,3
RAG3A-685	CTGGTTATTCCTCTTGTC (ID SEC N.º: 865)	CUGGUUAUUCUUCUUGUCATT (ID SEC N.º: 1307)	UGACAAGAGGAUAACCAGTT (ID SEC N.º: 1749)	1,3
RAG3A-1103	CACTCCCAGCCTCCTTTCT (ID SEC N.º: 866)	CACUCCCAGCCUCCUUUCUTT (ID SEC N.º: 1308)	AGAAAGGAGGCUGGGAGUGTT (ID SEC N.º: 1750)	1,3
RAG3A-1065	CTGCCTCCCTGTCTCCTGT (ID SEC N.º: 867)	CUGCCUCCCUGUCUCCUGUTT (ID SEC N.º: 1309)	ACAGGAGACAGGGAGGCAGTT (ID SEC N.º: 1751)	1,3
RAG3A-523	GCGCACATACATGTGCCCC (ID SEC N.º: 868)	GCGCACAUACAUGUGCCCCTT (ID SEC N.º: 1310)	GGGGCACAUGUAUGUGCGCTT (ID SEC N.º: 1752)	1,3
RAG3A-590	TAGCCATCTAAGCCACTGG (ID SEC N.º: 869)	UAGCCAUCUAAGCCACUGGTT (ID SEC N.º: 1311)	CCAGUGGCUUAGAUGGCUATT (ID SEC N.º: 1753)	1,3
RAG3A-505	CGCACCTGACAGTCCACTC (ID SEC N.º: 870)	CGCACCUGACAGUCCACUUCTT (ID SEC N.º: 1312)	GAGUGGACUGUCAGGUGCGTT (ID SEC N.º: 1754)	1,3
RAG3A-1247	CTAGCCAGAAACCGGCAGC (ID SEC N.º: 871)	CUAGCCAGAAACCGGCAGCTT (ID SEC N.º: 1313)	GCUGCCGGUUUCUGGCUAGTT (ID SEC N.º: 1755)	1,3

RAG3A-1281	CGCTCCTCATTCTTGTGTT (ID SEC N.º: 872)	CGCUCCUCAUUCUUGUGUUTT (ID SEC N.º: 1314)	AACACAAGAAUGAGGAGCGTT (ID SEC N.º: 1756)	1,3
RAG3A-747	GCAGGGAGGTATTTGCGGG (ID SEC N.º: 873)	GCAGGGAGGUAAUUGCGGGTT (ID SEC N.º: 1315)	CCCGCAAAUACCUGCCUGCTT (ID SEC N.º: 1757)	1,3
RAG3A-1220	TTCTGTGGAGTGACAGTAT (ID SEC N.º: 874)	UUCUGUGGAGUGACAGUAUTT (ID SEC N.º: 1316)	AUACUGUCACUCCACAGAATT (ID SEC N.º: 1758)	1,3
RAG3A-1268	TGTGTTACCCAGGACAGGG (ID SEC N.º: 875)	UGUGUUACCCAGGACAGGGTT (ID SEC N.º: 1317)	CCCUGUCCUGGGUAACACATT (ID SEC N.º: 1759)	1,3
RAG3A-782	GAGCTAGAGCCAGGGCCAA (ID SEC N.º: 876)	GAGCUAGAGCCAGGGCCAATT (ID SEC N.º: 1318)	UUGGCCCUGGCUCUAGCUCTT (ID SEC N.º: 1760)	1,3
RAG3A-107	GTGTGGGTGGAGGAGTGGA (ID SEC N.º: 877)	GUGUGGGUGGAGGAGUGGATT (ID SEC N.º: 1319)	UCCACUCCUCCACCCACACTT (ID SEC N.º: 1761)	1,3
RAG3A-923	ACATGCCCATCCTTGGGGA (ID SEC N.º: 878)	ACAUGCCCAUCCUUGGGGATT (ID SEC N.º: 1320)	UCCCCAAGGAUGGGCAUGUTT (ID SEC N.º: 1762)	1,3
RAG3A-349	AAAGCAAGCATCCTGTTGG (ID SEC N.º: 879)	AAAGCAAGCAUCCUGUUGGTT (ID SEC N.º: 1321)	CCAACAGGAUGCUUGCUUUTT (ID SEC N.º: 1763)	1,3
RAG3A-1085	TCTTGTTCCCTGGTCATG (ID SEC N.º: 880)	UCUUGGUUCCCUGGUCAUGTT (ID SEC N.º: 1322)	CAUGACCAGGGGAACCAAGATT (ID SEC N.º: 1764)	1,3
RAG3A-432	ATGTGGGCAATATCCGTGT (ID SEC N.º: 881)	AUGUGGGCAAUAUCCGUGUTT (ID SEC N.º: 1323)	ACACGGAUAUUGCCCACAUTT (ID SEC N.º: 1765)	1,3
RAG3A-129	ATCCAAATCTTCTCCGTGG (ID SEC N.º: 882)	AUCCAAAUCUUCUCCGUGGTT (ID SEC N.º: 1324)	CCACGGAGAAGAUUUGGAUTT (ID SEC N.º: 1766)	1,3
RAG3A-830	CCTGAGGACAGAGACTGTG (ID SEC N.º: 883)	CCUGAGGACAGAGACUGUGTT (ID SEC N.º: 1325)	CACAGUCUCUGUCCUCAGGTT (ID SEC N.º: 1767)	1,3
RAG3A-74	GGGGCTCCAGGGAAGAGAA (ID SEC N.º: 884)	GGGGCUCCAGGGAAGAGAATT (ID SEC N.º: 1326)	UUCUCUUCCCUGGAGCCCCTT (ID SEC N.º: 1768)	1,3
RAG3A-856	TGGGATCAAGGTCAGGCCA (ID SEC N.º: 885)	UGGGAUCAAGGUCAGGCCATT (ID SEC N.º: 1327)	UGGCCUGACCUUGAUCCCAT (ID SEC N.º: 1769)	1,3
RAG3A-435	CTCATGTGGGCAATATCCG (ID SEC N.º: 886)	CUCAUGUGGGCAAUAUCCGTT (ID SEC N.º: 1328)	CGGAUAUUGCCCACAUGAGTT (ID SEC N.º: 1770)	1,3

RAG3A-564	CAGACGAGCACCTAAGCTC (ID SEC N.º: 887)	CAGACGAGCACCUAAGCUCTT (ID SEC N.º: 1329)	GAGCUUAGGUGCUCGUCUGTT (ID SEC N.º: 1771)	1,3
RAG3A-1251	GGACCTAGCCAGAAACCGG (ID SEC N.º: 888)	GGACCUAGCCAGAAACCGGTT (ID SEC N.º: 1330)	CCGGUUUCUGGCUAGGUCCTT (ID SEC N.º: 1772)	1,3
RAG3A-1291	TCTCTGAGGTCGCTCCTCA (ID SEC N.º: 889)	UCUCUGAGGUCGCUCCUCATT (ID SEC N.º: 1331)	UGAGGAGCGACCUCAGAGATT (ID SEC N.º: 1773)	1,3
RAG3A-781	AGCTAGAGCCAGGGCCAAA (ID SEC N.º: 890)	AGCUAGAGCCAGGGCCAAATT (ID SEC N.º: 1332)	UUUGGCCCUUGGCUUAGCUTT (ID SEC N.º: 1774)	1,3
RAG3A-261	CTTAAACAAGACCTCTGTG (ID SEC N.º: 891)	CUUAAACAAGACCUCUGUGTT (ID SEC N.º: 1333)	CACAGAGGUCUUGUUUAAGTT (ID SEC N.º: 1775)	1,3
RAG3A-1098	CCAGCCTCCTTTCTCTTGG (ID SEC N.º: 892)	CCAGCCUCCUUUCUCUUGGTT (ID SEC N.º: 1334)	CCAAGAGAAAGGAGGCUGGTT (ID SEC N.º: 1776)	1,3
RAG3A-565	GCAGACGAGCACCTAAGCT (ID SEC N.º: 893)	GCAGACGAGCACCUAAGCUTT (ID SEC N.º: 1335)	AGCUUAGGUGCUCGUCUGCTT (ID SEC N.º: 1777)	1,2
RAG3A-930	TCAGCAGACATGCCCATCC (ID SEC N.º: 894)	UCAGCAGACAUGCCCAUCCTT (ID SEC N.º: 1336)	GGAUGGGCAUGUCUGCUGATT (ID SEC N.º: 1778)	1,2
RAG3A-422	TATCCGTGTTCCCACTTCG (ID SEC N.º: 895)	UAUCCGUGUCCACUUCGTT (ID SEC N.º: 1337)	CGAAGUGGGAACACGGAUATT (ID SEC N.º: 1779)	1,2
RAG3A-516	TACATGTGCCCCGCACCTG (ID SEC N.º: 896)	UACAUGUGCCCCGCACCUGTT (ID SEC N.º: 1338)	CAGGUGCGGGGCACAUGUATT (ID SEC N.º: 1780)	1,2
RAG3A-1190	TGTAACCTATCCTCAGGCG (ID SEC N.º: 897)	UGUAACUUAUCCUCAGGCGTT (ID SEC N.º: 1339)	CGCCUGAGGAUAAGUUACATT (ID SEC N.º: 1781)	1,2
RAG3A-360	AGAAAAGCAGGAAAGCAAG (ID SEC N.º: 898)	AGAAAAGCAGGAAAGCAAGTT (ID SEC N.º: 1340)	CUUGCUUCCUGCUUUUCUTT (ID SEC N.º: 1782)	1,2
RAG3A-126	CAAATCTTCTCCGTGGTGT (ID SEC N.º: 899)	CAAUCUUCUCCGUGGUGUTT (ID SEC N.º: 1341)	ACACCACGGAGAAGAUUUGTT (ID SEC N.º: 1783)	1,2
RAG3A-938	CACACTTCTCAGCAGACAT (ID SEC N.º: 900)	CACACUUCUCAGCAGACAUTT (ID SEC N.º: 1342)	AUGUCUGCUGAGAAGUGUGTT (ID SEC N.º: 1784)	1,2
RAG3A-853	GATCAAGGTCAGGCCAGGA (ID SEC N.º: 901)	GAUCAAGGUCAGGCCAGGATT (ID SEC N.º: 1343)	UCCUGGCCUGACCUUGAUCTT (ID SEC N.º: 1785)	1,2

RAG3A-716	GCTGTCTTTCCTAAGACAG (ID SEC N.º: 902)	GCUGUCUUUCCUAAGACAGTT (ID SEC N.º: 1344)	CUGUCUUAGGAAAGACAGCTT (ID SEC N.º: 1786)	1,2
RAG3A-1027	CCACTATCCTCCCAGCTAT (ID SEC N.º: 903)	CCACUAUCCUCCCAGCUAUTT (ID SEC N.º: 1345)	AUAGCUGGGAGGAUAGUGGTT (ID SEC N.º: 1787)	1,2
RAG3A-640	CGGAGACAGAACAAGCAAA (ID SEC N.º: 904)	CGGAGACAGAACAAGCAAATT (ID SEC N.º: 1346)	UUUGCUUGUUCUGUCUCCGTT (ID SEC N.º: 1788)	1,2
RAG3A-284	CAGGGAGTGAAAACCCAC (ID SEC N.º: 905)	CAGGGAGUGAAAACCCACTT (ID SEC N.º: 1347)	GUGGGGUUUUCACUCCUGTT (ID SEC N.º: 1789)	1,2
RAG3A-705	TAAGACAGGGACACATGGG (ID SEC N.º: 906)	UAAGACAGGGACACAUGGGTT (ID SEC N.º: 1348)	CCCAUGUGUCCCUGUCUUATT (ID SEC N.º: 1790)	1,2
RAG3A-1315	TGCCTAGCCTGCCTCCCTA (ID SEC N.º: 907)	UGCCUAGCCUGCCUCCCUATT (ID SEC N.º: 1349)	UAGGGAGGCAGGCUAGGCATT (ID SEC N.º: 1791)	1,2
RAG3A-1381	TCCATCAGCCGATCTCCCC (ID SEC N.º: 908)	UCCAUCAGCCGAUCUCCCCTT (ID SEC N.º: 1350)	GGGGAGAUCCGCGUGAUGGATT (ID SEC N.º: 1792)	1,2
RAG3A-558	AGCACCTAAGCTCAGGCTT (ID SEC N.º: 909)	AGCACCUAAGCUCAGGCUUTT (ID SEC N.º: 1351)	AAGCCUGAGCUUAGGUGCUTT (ID SEC N.º: 1793)	1,2
RAG3A-498	GACAGTCCACTCAACCCGT (ID SEC N.º: 910)	GACAGUCCACUCAACCCGUTT (ID SEC N.º: 1352)	ACGGGUUGAGUGGACUGUCTT (ID SEC N.º: 1794)	1,2
RAG3A-581	AAGCCACTGGACCCCAGCA (ID SEC N.º: 911)	AAGCCACUGGACCCCAGCATT (ID SEC N.º: 1353)	UGCUGGGGUCCAGUGGCUUTT (ID SEC N.º: 1795)	1,2
RAG3A-1135	CTTCACCCAAGGGACCCTC (ID SEC N.º: 912)	CUUCACCCAAGGGACCCUCTT (ID SEC N.º: 1354)	GAGGGUCCCUUGGGUGAAGTT (ID SEC N.º: 1796)	1,2
RAG3A-1070	CATGCCTGCCTCCCTGTCT (ID SEC N.º: 913)	CAUGCCUGCCUCCCUGUCUTT (ID SEC N.º: 1355)	AGACAGGGAGGCAGGCAUGTT (ID SEC N.º: 1797)	1,2
RAG3A-1181	TCCTCAGGCGCATTCGACA (ID SEC N.º: 914)	UCCUCAGGCGCAUUCGACATT (ID SEC N.º: 1356)	UGUCGAAUGCGCCUGAGGATT (ID SEC N.º: 1798)	1,2
RAG3A-1206	AGTATCTCCCTCTCATTGT (ID SEC N.º: 915)	AGUAUCUCCUCUCAUUGUTT (ID SEC N.º: 1357)	ACAAUGAGAGGGAGAUACUTT (ID SEC N.º: 1799)	1,2
RAG3A-461	ACACCAACCCATAACAGGA (ID SEC N.º: 916)	ACACCAACCCAUAACAGGATT (ID SEC N.º: 1358)	UCCUGUUAUGGGUUGGUGUTT (ID SEC N.º: 1800)	1,2

RAG3A-242	CTTCTTCCCCAGCAACACA (ID SEC N.º: 917)	CUUCUUCCCCAGCAACACATT (ID SEC N.º: 1359)	UGUGUUGCUGGGGAAGAAGTT (ID SEC N.º: 1801)	1,2
RAG3A-1127	AAGGGACCCTCTGCCTCTC (ID SEC N.º: 918)	AAGGGACCCUCUGCCUCUCTT (ID SEC N.º: 1360)	GAGAGGCAGAGGGUCCCUUTT (ID SEC N.º: 1802)	1,2
RAG3A-419	CCGTGTTCCCACTTCGAAA (ID SEC N.º: 919)	CCGUGUUCCACUUCGAAATT (ID SEC N.º: 1361)	UUUCGAAGUGGGAACACGGTT (ID SEC N.º: 1803)	1,2
RAG3A-790	AAGCAAAGGAGCTAGAGCC (ID SEC N.º: 920)	AAGCAAAGGAGCUAGAGCCTT (ID SEC N.º: 1362)	GGCUCUAGCUCCUUUGCUUTT (ID SEC N.º: 1804)	1,2
RAG3A-635	ACAGAACAAGCAAAGGAGG (ID SEC N.º: 921)	ACAGAACAAGCAAAGGAGGTT (ID SEC N.º: 1363)	CCUCCUUUGCUUGUUCUGUTT (ID SEC N.º: 1805)	1,2
RAG3A-673	CTTGTCACATGTGGAACGG (ID SEC N.º: 922)	CUUGUCACAUGUGGAACGGTT (ID SEC N.º: 1364)	CCGUUCCACAUGUGACAAGTT (ID SEC N.º: 1806)	1,2
RAG3A-1001	CCCTCCTTCCTAATCTTGG (ID SEC N.º: 923)	CCCUCCUCCUAAUCUUGGTT (ID SEC N.º: 1365)	CCAAGAUUAGGAAGGAGGGTT (ID SEC N.º: 1807)	1,2
RAG3A-1005	AGCACCTCCTTCCTAATC (ID SEC N.º: 924)	AGCACCCUCCUCCUAAUCTT (ID SEC N.º: 1366)	GAUUAGGAAGGAGGGUGCUTT (ID SEC N.º: 1808)	1,2
RAG3A-1064	TGCCTCCCTGTCTCCTGTC (ID SEC N.º: 925)	UGCCUCCCUGUCUCCUGUCTT (ID SEC N.º: 1367)	GACAGGAGACAGGGAGGCATT (ID SEC N.º: 1809)	1,2
RAG3A-801	GACTGGGAAGAAAGCAAAG (ID SEC N.º: 926)	GACUGGGAAGAAAGCAAAGTT (ID SEC N.º: 1368)	CUUUGCUUUCUUCCAGUCTT (ID SEC N.º: 1810)	1,2
RAG3A-486	AACCCGTCCAAACCCTTTC (ID SEC N.º: 927)	AACCCGUCCAAACCCUUUCTT (ID SEC N.º: 1369)	GAAAGGGUUUGGACGGGUUTT (ID SEC N.º: 1811)	1,2
RAG3A-555	ACCTAAGCTCAGGCTTAAC (ID SEC N.º: 928)	ACCUAAGCUCAGGCUUAACTT (ID SEC N.º: 1370)	GUUAAGCCUGAGCUUAGGUTT (ID SEC N.º: 1812)	1,2
RAG3A-854	GGATCAAGGTCAGGCCAGG (ID SEC N.º: 929)	GGAUCAAGGUCAGGCCAGGTT (ID SEC N.º: 1371)	CCUGGCCUGACCUUGAUCCTT (ID SEC N.º: 1813)	1,2
RAG3A-1267	GTGTTACCCAGGACAGGGA (ID SEC N.º: 930)	GUGUUACCCAGGACAGGGATT (ID SEC N.º: 1372)	UCCUGUCCUGGGUAACACTT (ID SEC N.º: 1814)	1,2
RAG3A-1264	TTACCCAGGACAGGGACCT (ID SEC N.º: 931)	UUACCCAGGACAGGGACCUTT (ID SEC N.º: 1373)	AGGUCCCUGUCCUGGGUAATT (ID SEC N.º: 1815)	1,2

RAG3A-513	ATGTGCCCCGCACCTGACA (ID SEC N.º: 932)	AUGUGCCCCGCACCUGACATT (ID SEC N.º: 1374)	UGUCAGGUGCGGGGCACAUTT (ID SEC N.º: 1816)	1,2
RAG3A-1286	GAGGTCGCTCCTCATTCTT (ID SEC N.º: 933)	GAGGUCGCUCCUCAUUCUUTT (ID SEC N.º: 1375)	AAGAAUGAGGAGCGACCUCTT (ID SEC N.º: 1817)	1,2
RAG3A-653	AGGAGATGGAAGACGGAGA (ID SEC N.º: 934)	AGGAGAUGGAAGACGGAGATT (ID SEC N.º: 1376)	UCUCCGUCUCCAUCUCCUTT (ID SEC N.º: 1818)	1,2
RAG3A-1014	AGCTATCCCAGCACCTCC (ID SEC N.º: 935)	AGCUAUCCCAGCACCCUCCTT (ID SEC N.º: 1377)	GGAGGGUGCUGGGAUAGCUTT (ID SEC N.º: 1819)	1,2
RAG3A-61	AGAGAAGGCGTCACTTCCG (ID SEC N.º: 936)	AGAGAAGGCGUCACUCCGTT (ID SEC N.º: 1378)	CGGAAGUGACGCCUUCUCUTT (ID SEC N.º: 1820)	1,2
RAG3A-666	CATGTGGAACGGTAGGAGA (ID SEC N.º: 937)	CAUGUGGAACGGUAGGAGATT (ID SEC N.º: 1379)	UCUCCUACCGUCCACAUGTT (ID SEC N.º: 1821)	1,2
RAG3A-348	AAGCAAGCATCCTGTTGGA (ID SEC N.º: 938)	AAGCAAGCAUCCUGUUGGATT (ID SEC N.º: 1380)	UCCAACAGGAUGCUUGCUUTT (ID SEC N.º: 1822)	1,2
RAG3A-545	AGGCTTAACCCAGTGCACG (ID SEC N.º: 939)	AGGCUUAACCCAGUGCACGTT (ID SEC N.º: 1381)	CGUGCACUGGGUUAAGCCUTT (ID SEC N.º: 1823)	1,2
RAG3A-584	TCTAAGCCACTGGACCCCA (ID SEC N.º: 940)	UCUAAGCCACUGGACCCCAT (ID SEC N.º: 1382)	UGGGGUCCAGUGGCUUAGATT (ID SEC N.º: 1824)	1,2
RAG3A-1162	GTCCCCTCTTGCTTTCTCA (ID SEC N.º: 941)	GUCCCCUCUUGCUUUCUCATT (ID SEC N.º: 1383)	UGAGAAAGCAAGAGGGGACTT (ID SEC N.º: 1825)	1,2
RAG3A-308	CCAGGGAAAAGAAATTTGG (ID SEC N.º: 942)	CCAGGGAAAAGAAAUUUGGTT (ID SEC N.º: 1384)	CCAAAUUUCUUUCCUGGTT (ID SEC N.º: 1826)	1,2
RAG3A-158	CCCATGTCCAGGAAAAGAT (ID SEC N.º: 943)	CCCAUGUCCAGGAAAAGAUTT (ID SEC N.º: 1385)	AUCUUUCCUGGACAUGGGTT (ID SEC N.º: 1827)	1,2
RAG3A-161	TTGCCCATGTCCAGGAAAA (ID SEC N.º: 944)	UUGCCCAUGUCCAGGAAAATT (ID SEC N.º: 1386)	UUUCCUGGACAUGGGCAATT (ID SEC N.º: 1828)	1,2
RAG3A-1253	AGGGACCTAGCCAGAAACC (ID SEC N.º: 945)	AGGGACCUAGCCAGAAACCTT (ID SEC N.º: 1387)	GGUUUCUGGCUAGGUCCUTT (ID SEC N.º: 1829)	1,2
RAG3A-926	CAGACATGCCATCCTTGG (ID SEC N.º: 946)	CAGACAUGCCCAUCCUUGGTT (ID SEC N.º: 1388)	CCAAGGAUGGGCAUGUCUGTT (ID SEC N.º: 1830)	1,2

RAG3A-1191	TTGTAACCTTATCCTCAGGC (ID SEC N.º: 947)	UUGUAACUUAUCCUCAGGCTT (ID SEC N.º: 1389)	GCCUGAGGAUAAGUUACAATT (ID SEC N.º: 1831)	1,2
RAG3A-697	GGACACATGGGCCTGGTTA (ID SEC N.º: 948)	GGACACAUGGGCCUGGUUATT (ID SEC N.º: 1390)	UAACCAGGCCCAUGUGUCCTT (ID SEC N.º: 1832)	1,2
RAG3A-1224	CCCCTTCTGTGGAGTGACA (ID SEC N.º: 949)	CCCCUUCUGUGGAGUGACATT (ID SEC N.º: 1391)	UGUCACUCCACAGAAGGGGTT (ID SEC N.º: 1833)	1,2
RAG3A-964	GGACGGGAAAATTCCAGGA (ID SEC N.º: 950)	GGACGGGAAAUAUCCAGGATT (ID SEC N.º: 1392)	UCCUGGAAUUUUCGUCCTT (ID SEC N.º: 1834)	1,2
RAG3A-791	AAAGCAAAGGAGCTAGAGC (ID SEC N.º: 951)	AAAGCAAAGGAGCUAGAGCTT (ID SEC N.º: 1393)	GCUCUAGCUCCUUUGCUUUTT (ID SEC N.º: 1835)	1,2
RAG3A-526	TGTGCGCACATACATGTGC (ID SEC N.º: 952)	UGUGCGCACAUACAUGUGCTT (ID SEC N.º: 1394)	GCACAUGUAUGUGCGCACATT (ID SEC N.º: 1836)	1,2
RAG3A-972	GTCTGGCTGGACGGGAAAA (ID SEC N.º: 953)	GUCUGGCUGGACGGGAAAATT (ID SEC N.º: 1395)	UUUUCGCGUCCAGCCAGACTT (ID SEC N.º: 1837)	1,2
RAG3A-289	ATAGCCAGGGAGTGAAAAC (ID SEC N.º: 954)	AUAGCCAGGGAGUGAAAATT (ID SEC N.º: 1396)	GUUUUCACUCCUGGCUAUTT (ID SEC N.º: 1838)	1,2
RAG3A-255	CAAGACCTCTGTGCTTCTT (ID SEC N.º: 955)	CAAGACCUCUGUGCUUCUUTT (ID SEC N.º: 1397)	AAGAAGCACAGAGGUCUUGTT (ID SEC N.º: 1839)	1,2
RAG3A-1000	CCTCCTTCCTAATCTTGGG (ID SEC N.º: 956)	CCUCCUCCUAAUCUUGGGTT (ID SEC N.º: 1398)	CCCAAGAUUAGGAAGGAGGTT (ID SEC N.º: 1840)	1,2
RAG3A-694	CACATGGGCCTGGTTATTC (ID SEC N.º: 957)	CACAUGGGCCUGGUUAUUCTT (ID SEC N.º: 1399)	GAAUAACCAGGCCCAUGUGTT (ID SEC N.º: 1841)	1,2
RAG3A-549	GCTCAGGCTTAACCCAGTG (ID SEC N.º: 958)	GCUCAGGCUUAACCCAGUGTT (ID SEC N.º: 1400)	CACUGGGUUAAGCCUGAGCTT (ID SEC N.º: 1842)	1,2
RAG3A-1240	GAAACCGGCAGCATTCCCC (ID SEC N.º: 959)	GAAACCGGCAGCAUUCCTT (ID SEC N.º: 1401)	GGGGAAUGCUGCCGGUUUCTT (ID SEC N.º: 1843)	1,2
RAG3A-978	CATCTCGTCTGGCTGGACG (ID SEC N.º: 960)	CAUCUCGUCUGGCUGGACGTT (ID SEC N.º: 1402)	CGUCCAGCCAGACGAGAUGTT (ID SEC N.º: 1844)	1,2
RAG3A-1290	CTCTGAGGTCGCTCCTCAT (ID SEC N.º: 961)	CUCUGAGGUCGCUCCUCAUTT (ID SEC N.º: 1403)	AUGAGGAGCGACCUCAGAGTT (ID SEC N.º: 1845)	1,2

RAG3A-1006	CAGCACCTCCTTCCTAAT (ID SEC N.º: 962)	CAGCACCCUCCUCCUAAUTT (ID SEC N.º: 1404)	AUUAGGAAGGAGGGUGCUGTT (ID SEC N.º: 1846)	1,2
RAG3A-1311	TAGCCTGCCTCCCTACCTT (ID SEC N.º: 963)	UAGCCUGCCUCCCUACCUUTT (ID SEC N.º: 1405)	AAGGUAGGGAGGCAGGCUATT (ID SEC N.º: 1847)	1,2
RAG3A-42	GGGGCCTTCACCAGTGTCT (ID SEC N.º: 964)	GGGGCCUUCACCAGUGUCUTT (ID SEC N.º: 1406)	AGACACUGGUGAAGGCCCTT (ID SEC N.º: 1848)	1,2
RAG3A-21	TGGCTCCCTTCTCTGATTG (ID SEC N.º: 965)	UGGCUCCCUUCUCUGAUUGTT (ID SEC N.º: 1407)	CAAUCAGAGAAGGGAGCCATT (ID SEC N.º: 1849)	1,2
RAG3A-59	AGAAGGCGTCACTTCCGGG (ID SEC N.º: 966)	AGAAGGCGUCACUCCGGGTT (ID SEC N.º: 1408)	CCCGGAAGUGACGCCUUCUTT (ID SEC N.º: 1850)	1,2
RAG3A-1187	AACTTATCCTCAGGCGCAT (ID SEC N.º: 967)	AACUUAUCCUCAGGCGCAUTT (ID SEC N.º: 1409)	AUGCGCCUGAGGAUAAGUUTT (ID SEC N.º: 1851)	1,2
RAG3A-576	ACTGGACCCAGCAGACGA (ID SEC N.º: 968)	ACUGGACCCAGCAGACGATT (ID SEC N.º: 1410)	UCGUCUGCUGGGGUCCAGUTT (ID SEC N.º: 1852)	1,1
RAG3A-639	GGAGACAGAACAAGCAAAG (ID SEC N.º: 969)	GGAGACAGAACAAGCAAAGTT (ID SEC N.º: 1411)	CUUUGCUUGUUCUGUCUCCTT (ID SEC N.º: 1853)	1,1
RAG3A-815	TGTGGGGAGACTGGGACTG (ID SEC N.º: 970)	UGUGGGGAGACUGGGACUGTT (ID SEC N.º: 1412)	CAGUCCCAGUCUCCCCACATT (ID SEC N.º: 1854)	1,1
RAG3A-957	AAAATTCCAGGATCTAGGC (ID SEC N.º: 971)	AAAUAUCCAGGAUCUAGGCTT (ID SEC N.º: 1413)	GCCUAGAUCUGGAUUUUUTT (ID SEC N.º: 1855)	1,1
RAG3A-1217	TGTGGAGTGACAGTATCTC (ID SEC N.º: 972)	UGUGGAGUGACAGUAUCUCTT (ID SEC N.º: 1414)	GAGAUACUGUCACUCCACATT (ID SEC N.º: 1856)	1,1
RAG3A-1165	ACAGTCCCCTCTTGCTTTC (ID SEC N.º: 973)	ACAGUCCCCUCUUGCUUUCTT (ID SEC N.º: 1415)	GAAAGCAAGAGGGGACUGUTT (ID SEC N.º: 1857)	1,1
RAG3A-1134	TTCACCCAAGGGACCCTCT (ID SEC N.º: 974)	UUCACCCAAGGGACCCUCUTT (ID SEC N.º: 1416)	AGAGGGUCCCUUGGGUGAATT (ID SEC N.º: 1858)	1,1
RAG3A-667	ACATGTGGAACGGTAGGAG (ID SEC N.º: 975)	ACAUGUGGAACGGUAGGAGTT (ID SEC N.º: 1417)	CUCCUACCGUCCACAUGUTT (ID SEC N.º: 1859)	1,1
RAG3A-1339	CAAACCCTCACCACCCTCT (ID SEC N.º: 976)	CAAACCCUCACCACCUCUTT (ID SEC N.º: 1418)	AGAGGGUGGUGAGGGUUUGTT (ID SEC N.º: 1860)	1,1

RAG3A-676	CCTCTTGTCACATGTGGAA (ID SEC N.º: 977)	CCUCUUGUCACAUGUGGAATT (ID SEC N.º: 1419)	UUCCACAUGUGACAAGAGGTT (ID SEC N.º: 1861)	1,1
RAG3A-153	GTCCAGGAAAAGATGGATC (ID SEC N.º: 978)	GUCCAGGAAAAGAUGGAUCTT (ID SEC N.º: 1420)	GAUCCAUCUUUCCUGGACTT (ID SEC N.º: 1862)	1,1
RAG3A-320	CAGGTATGATGTCCAGGGA (ID SEC N.º: 979)	CAGGUAUGAUGUCCAGGGATT (ID SEC N.º: 1421)	UCCCUGGACAUCAUACCUGTT (ID SEC N.º: 1863)	1,1
RAG3A-1010	ATCCCAGCACCTCCTTCC (ID SEC N.º: 980)	AUCCCAGCACCCUCCUUCCTT (ID SEC N.º: 1422)	GGAAGGAGGGUGCUGGGAUTT (ID SEC N.º: 1864)	1,1
RAG3A-999	CTCCTTCCTAATCTTGGGA (ID SEC N.º: 981)	CUCCUUCCUAAUCUUGGGATT (ID SEC N.º: 1423)	UCCCAAGAUUAGGAAGGAGTT (ID SEC N.º: 1865)	1,1
RAG3A-567	CAGCAGACGAGCACCTAAG (ID SEC N.º: 982)	CAGCAGACGAGCACCUAAGTT (ID SEC N.º: 1424)	CUUAGGUGCUCGUCUGCUGTT (ID SEC N.º: 1866)	1,1
RAG3A-862	GGATGATGGGATCAAGGTC (ID SEC N.º: 983)	GGAUGAUGGGAUCAAGGUCTT (ID SEC N.º: 1425)	GACCUUGAUCCCAUCAUCCTT (ID SEC N.º: 1867)	1,1
RAG3A-460	CACCAACCCATAACAGGAG (ID SEC N.º: 984)	CACCAACCCAUAACAGGAGTT (ID SEC N.º: 1426)	CUCCUGUUAUGGGUUGGUGTT (ID SEC N.º: 1868)	1,1
RAG3A-921	ATGCCCATCCTTGGGGAGG (ID SEC N.º: 985)	AUGCCCAUCCUUGGGGAGGTT (ID SEC N.º: 1427)	CCUCCCCAAGGAUGGGCAUTT (ID SEC N.º: 1869)	1,1
RAG3A-704	AAGACAGGGACACATGGGC (ID SEC N.º: 986)	AAGACAGGGACACAUGGGCTT (ID SEC N.º: 1428)	GCCCAUGUGUCCCUGUCUUTT (ID SEC N.º: 1870)	1,1
RAG3A-233	CAGCAACACAAATGTCCTG (ID SEC N.º: 987)	CAGCAACACAAAUGUCCUGTT (ID SEC N.º: 1429)	CAGGACAUUUGUGUUGCUGTT (ID SEC N.º: 1871)	1,1
RAG3A-1203	ATCTCCCTCTCATTGTAAC (ID SEC N.º: 988)	AUCUCCCUCAUUGUAACTT (ID SEC N.º: 1430)	GUUACAAUGAGAGGGAGAUTT (ID SEC N.º: 1872)	1,1
RAG3A-247	CTGTGCTTCTTCCCCAGCA (ID SEC N.º: 989)	CUGUGCUUCUCCCCAGCATT (ID SEC N.º: 1431)	UGCUGGGGAAGAAGCACAGTT (ID SEC N.º: 1873)	1,1
RAG3A-721	CAGCAGCTGTCTTTCCTAA (ID SEC N.º: 990)	CAGCAGCUGUCUUUCCUAATT (ID SEC N.º: 1432)	UUAGGAAAGACAGCUGCUGTT (ID SEC N.º: 1874)	1,1
RAG3A-391	ACAAGATAGGACTCCCTAG (ID SEC N.º: 991)	ACAAGAUAGGACUCCCUAGTT (ID SEC N.º: 1433)	CUAGGGAGUCCUAUCUUGUTT (ID SEC N.º: 1875)	1,1

RAG3A-159	GCCCATGTCCAGGAAAAGA (ID SEC N.º: 992)	GCCCAUGUCCAGGAAAAGATT (ID SEC N.º: 1434)	UCUUUUCUGGACAUGGGGCTT (ID SEC N.º: 1876)	1,1
RAG3A-437	CTCTCATGTGGGCAATATC (ID SEC N.º: 993)	CUCUCAUGUGGGCAAUAUCTT (ID SEC N.º: 1435)	GAUAUUGCCCACAUGAGAGTT (ID SEC N.º: 1877)	1,1
RAG3A-29	GTGTCTGGTGGCTCCCTTC (ID SEC N.º: 994)	GUGUCUGGUGGCUCUUUCTT (ID SEC N.º: 1436)	GAAGGGAGCCACCAGACACTT (ID SEC N.º: 1878)	1,1
RAG3A-63	GAAGAGAAGGCGTCACTTC (ID SEC N.º: 995)	GAAGAGAAGGCGUCACUUCTT (ID SEC N.º: 1437)	GAAGUGACGCCUUCUCUUCTT (ID SEC N.º: 1879)	1,1
RAG3A-996	CTTCCTAATCTTGGGAGAC (ID SEC N.º: 996)	CUUCCUAAUCUUGGGAGACTT (ID SEC N.º: 1438)	GUCUCCCAAGAUUAGGAAGTT (ID SEC N.º: 1880)	1,1
RAG3A-1083	TTGGTTCCCTGGTCATGCC (ID SEC N.º: 997)	UUGGUUCCCUGGUCAUGCCTT (ID SEC N.º: 1439)	GGCAUGACCAGGGAACCAATT (ID SEC N.º: 1881)	1,1
RAG3A-1128	CAAGGGACCCTCTGCCTCT (ID SEC N.º: 998)	CAAGGGACCCUCUGCCUCUTT (ID SEC N.º: 1440)	AGAGGCAGAGGGUCCCUUGTT (ID SEC N.º: 1882)	1,1
RAG3A-1094	CCTCCTTTCTCTTGGTTCC (ID SEC N.º: 999)	CCUCCUUUCUCUUGGUUCCTT (ID SEC N.º: 1441)	GGAACCAAGAGAAAGGAGGTT (ID SEC N.º: 1883)	1,1
RAG3A-771	AGGGCCAAAGGAAAAGGGG (ID SEC N.º: 1000)	AGGGCCAAAGGAAAAGGGGTT (ID SEC N.º: 1442)	CCCCUUUCCUUUGGCCCTT (ID SEC N.º: 1884)	1,1
RAG3A-287	AGCCAGGGAGTGAAAACCC (ID SEC N.º: 1001)	AGCCAGGGAGUGAAAACCCTT (ID SEC N.º: 1443)	GGGUUUUCACUCCCUGGCUTT (ID SEC N.º: 1885)	1,1
RAG3A-981	AGACATCTCGTCTGGCTGG (ID SEC N.º: 1002)	AGACAUCUCGUCUGGCUGGTT (ID SEC N.º: 1444)	CCAGCCAGACGAGAUGUCUTT (ID SEC N.º: 1886)	1,1
RAG3A-23	GGTGGCTCCCTTCTCTGAT (ID SEC N.º: 1003)	GGUGGCUCUUUCUGAUTT (ID SEC N.º: 1445)	AUCAGAGAAGGGAGCCACCTT (ID SEC N.º: 1887)	1,1
RAG3A-1072	GTCATGCCTGCCTCCCTGT (ID SEC N.º: 1004)	GUCAUGCCUGCCUCCUGUTT (ID SEC N.º: 1446)	ACAGGGAGGCAGGCAUGACTT (ID SEC N.º: 1888)	1,1
RAG3A-415	GTTCCCACTTCGAAAGGGG (ID SEC N.º: 1005)	GUUCCACUUCGAAAGGGGTT (ID SEC N.º: 1447)	CCCCUUCGAAGUGGGAACTT (ID SEC N.º: 1889)	1,1
RAG3A-1287	TGAGGTCGCTCCTCATTCT (ID SEC N.º: 1006)	UGAGGUCGCUCCUCAUUCUTT (ID SEC N.º: 1448)	AGAAUGAGGAGCGACCUCATT (ID SEC N.º: 1890)	1,1

RAG3A-1201	CTCCCTCTCATTGTAACTT (ID SEC N.º: 1007)	CUCCCUCUCAUUGUAAACUUTT (ID SEC N.º: 1449)	AAGUUACAAUGAGAGGGAGTT (ID SEC N.º: 1891)	1,1
RAG3A-772	CAGGGCCAAAGGAAAAGGG (ID SEC N.º: 1008)	CAGGGCCAAAGGAAAAGGGTT (ID SEC N.º: 1450)	CCCUUUUCCUUUGGCCUGTT (ID SEC N.º: 1892)	1,1
RAG3A-1249	ACCTAGCCAGAAACCGGCA (ID SEC N.º: 1009)	ACCUAGCCAGAAACCGGCATT (ID SEC N.º: 1451)	UGCCGGUUUCUGGCUAGGUTT (ID SEC N.º: 1893)	1,1
RAG3A-546	CAGGCTTAACCCAGTGCAC (ID SEC N.º: 1010)	CAGGCUUAAACCCAGUGCACTT (ID SEC N.º: 1452)	GUGCACUGGGUUAAGCCUGTT (ID SEC N.º: 1894)	1,1
RAG3A-160	TGCCCATGTCCAGGAAAAG (ID SEC N.º: 1011)	UGCCCAUGUCCAGGAAAAGTT (ID SEC N.º: 1453)	CUUUUCCUGGACAUGGGCATT (ID SEC N.º: 1895)	1,1
RAG3A-64	GGAAGAGAAGGCGTCACTT (ID SEC N.º: 1012)	GGAAGAGAAGGCGUCACUUTT (ID SEC N.º: 1454)	AAGUGACGCCUUCUCUUCCTT (ID SEC N.º: 1896)	1,1
RAG3A-1002	ACCCTCCTTCCTAATCTTG (ID SEC N.º: 1013)	ACCCUCCUCCUAAUCUUGTT (ID SEC N.º: 1455)	CAAGAUUAGGAAGGAGGGUTT (ID SEC N.º: 1897)	1,1
RAG3A-1288	CTGAGGTCGCTCCTCATTC (ID SEC N.º: 1014)	CUGAGGUCGCUCCUCAUUCTT (ID SEC N.º: 1456)	GAAUGAGGAGCGACCUCAGTT (ID SEC N.º: 1898)	1,1
RAG3A-891	AGAGCCTGAGGAAGTTCTG (ID SEC N.º: 1015)	AGAGCCUGAGGAAGUUCUGTT (ID SEC N.º: 1457)	CAGAACUCCUCAGGCUCUTT (ID SEC N.º: 1899)	1,1
RAG3A-231	GCAACACAAATGTCCTGCC (ID SEC N.º: 1016)	GCAACACAAAUGUCCUGCCTT (ID SEC N.º: 1458)	GGCAGGACAUUUGUGUUGCTT (ID SEC N.º: 1900)	1,1
RAG3A-669	TCACATGTGGAACGGTAGG (ID SEC N.º: 1017)	UCACAUGUGGAACGGUAGGTT (ID SEC N.º: 1459)	CCUACCGUCCACAUGUGATT (ID SEC N.º: 1901)	1,1
RAG3A-1009	TCCCAGCACCCCTCCTTCCT (ID SEC N.º: 1018)	UCCCAGCACCCUCCUUCCTT (ID SEC N.º: 1460)	AGGAAGGAGGGUGCUGGGATT (ID SEC N.º: 1902)	1,1
RAG3A-656	GGTAGGAGATGGAAGACGG (ID SEC N.º: 1019)	GGUAGGAGAUGGAAGACGGTT (ID SEC N.º: 1461)	CCGUCUCCAUCUCCUACCTT (ID SEC N.º: 1903)	1,1
RAG3A-229	AACACAAATGTCCTGCCAG (ID SEC N.º: 1020)	AACACAAAUGUCCUGCCAGTT (ID SEC N.º: 1462)	CUGGCAGGACAUUUGUGUUTT (ID SEC N.º: 1904)	1,1
RAG3A-484	CCCGTCCAAACCCTTTCCC (ID SEC N.º: 1021)	CCCGUCCAAACCCUUUCCCTT (ID SEC N.º: 1463)	GGGAAAGGGUUUGGACGGGTT (ID SEC N.º: 1905)	1,1

RAG3A-799	CTGGGAAGAAAGCAAAGGA (ID SEC N.º: 1022)	CUGGGAAGAAAGCAAAGGATT (ID SEC N.º: 1464)	UCCUUUGCUUUCUUCCCAGTT (ID SEC N.º: 1906)	1,1
RAG3A-296	AATTTGGATAGCCAGGGAG (ID SEC N.º: 1023)	AAUUUGGAUAGCCAGGGAGTT (ID SEC N.º: 1465)	CUCCCUGGCUAUCCAAAUUTT (ID SEC N.º: 1907)	1,1
RAG3A-1183	TATCCTCAGGCGCATTCGA (ID SEC N.º: 1024)	UAUCCUCAGGCGCAUUCGATT (ID SEC N.º: 1466)	UCGAAUGCGCCUGAGGAUATT (ID SEC N.º: 1908)	1,1
RAG3A-380	CTCCCTAGGGGATTACAGA (ID SEC N.º: 1025)	CUCCCUAGGGGAUUACAGATT (ID SEC N.º: 1467)	UCUGUAAUCCCCUAGGGAGTT (ID SEC N.º: 1909)	1,1
RAG3A-157	CCATGTCCAGGAAAAGATG (ID SEC N.º: 1026)	CCAUGUCCAGGAAAAGAUGTT (ID SEC N.º: 1468)	CAUCUUUCCUGGACAUGGTT (ID SEC N.º: 1910)	1,1
RAG3A-1185	CTTATCCTCAGGCGCATTC (ID SEC N.º: 1027)	CUUAUCCUCAGGCGCAUUCTT (ID SEC N.º: 1469)	GAAUGCGCCUGAGGAUAAGTT (ID SEC N.º: 1911)	1,1
RAG3A-1244	GCCAGAAACCGGCAGCATT (ID SEC N.º: 1028)	GCCAGAAACCGGCAGCAUUTT (ID SEC N.º: 1470)	AAUGCUGCCGGUUUCUGGCTT (ID SEC N.º: 1912)	1,1
RAG3A-588	GCCATCTAAGCCACTGGAC (ID SEC N.º: 1029)	GCCAUCUAAGCCACUGGACTT (ID SEC N.º: 1471)	GUCCAGUGGCUUAGAUGGCTT (ID SEC N.º: 1913)	1,1
RAG3A-436	TCTCATGTGGGCAATATCC (ID SEC N.º: 1030)	UCUCAUGUGGGCAAUAUCCTT (ID SEC N.º: 1472)	GGAUAAUUGCCCACAUGAGATT (ID SEC N.º: 1914)	1,1
RAG3A-1029	ACCCACTATCCTCCCAGCT (ID SEC N.º: 1031)	ACCCACUAUCCUCCCAGCUTT (ID SEC N.º: 1473)	AGCUGGGAGGAUAGUGGGUTT (ID SEC N.º: 1915)	1,1
RAG3A-28	TGTCTGGTGGCTCCCTTCT (ID SEC N.º: 1032)	UGUCUGGUGGCUCCCUUCUTT (ID SEC N.º: 1474)	AGAAGGGAGCCACCAGACATT (ID SEC N.º: 1916)	1,1
RAG3A-234	CCAGCAACACAAATGTCCT (ID SEC N.º: 1033)	CCAGCAACACAAAUGUCCUTT (ID SEC N.º: 1475)	AGGACAUUUGUGUUGCUGGTT (ID SEC N.º: 1917)	1,1
RAG3A-249	CTCTGTGCTTCTTCCCCAG (ID SEC N.º: 1034)	CUCUGUGCUUCUUCCCCAGTT (ID SEC N.º: 1476)	CUGGGGAAGAAGCACAGAGTT (ID SEC N.º: 1918)	1,1
RAG3A-775	AGCCAGGGCCAAAGGAAAA (ID SEC N.º: 1035)	AGCCAGGGCCAAAGGAAAATT (ID SEC N.º: 1477)	UUUUCCUUUGGCCUGGCUTT (ID SEC N.º: 1919)	1,1
RAG3A-951	CCAGGATCTAGGCCACACT (ID SEC N.º: 1036)	CCAGGAUCUAGGCCACACUTT (ID SEC N.º: 1478)	AGUGUGGCCUAGAUCUGGTT (ID SEC N.º: 1920)	1,1

RAG3A-861	GATGATGGGATCAAGGTCA (ID SEC N.º: 1037)	GAUGAUGGGAUCAAGGUCATT (ID SEC N.º: 1479)	UGACCUUGAUCCCAUCAUCTT (ID SEC N.º: 1921)	1,1
RAG3A-259	TAAACAAGACCTCTGTGCT (ID SEC N.º: 1038)	UAAACAAGACCUCUGUGCUTT (ID SEC N.º: 1480)	AGCACAGAGGUCUUGUUUATT (ID SEC N.º: 1922)	1,1
RAG3A-394	ATGACAAGATAGGACTCCC (ID SEC N.º: 1039)	AUGACAAGAUAGGACUCCCTT (ID SEC N.º: 1481)	GGGAGUCCUAUCUUGUCAUTT (ID SEC N.º: 1923)	1,1
RAG3A-534	AGTGCACGTGTGCGCACAT (ID SEC N.º: 1040)	AGUGCACGUGUGCGCACAUTT (ID SEC N.º: 1482)	AUGUGCGCACACGUGCACUTT (ID SEC N.º: 1924)	1,1
RAG3A-316	TATGATGTCCAGGGAAAAG (ID SEC N.º: 1041)	UAUGAUGUCCAGGGAAAAGTT (ID SEC N.º: 1483)	CUUUUCCCUGGACAUCAUATT (ID SEC N.º: 1925)	1,1
RAG3A-560	CGAGCACCTAAGCTCAGGC (ID SEC N.º: 1042)	CGAGCACCUAAGCUCAGGCTT (ID SEC N.º: 1484)	GCCUGAGCUUAGGUGCUCGTT (ID SEC N.º: 1926)	1,1
RAG3A-1105	CCCACTCCCAGCCTCCTTT (ID SEC N.º: 1043)	CCCACUCCAGCCUCCUUUTT (ID SEC N.º: 1485)	AAAGGAGGCUGGGAGUGGGTT (ID SEC N.º: 1927)	1,1
RAG3A-709	TTCCTAAGACAGGGACACA (ID SEC N.º: 1044)	UCCCUAAGACAGGGACACATT (ID SEC N.º: 1486)	UGUGUCCCUGUCUUAGGAATT (ID SEC N.º: 1928)	1,1
RAG3A-948	GGATCTAGGCCACACTTCT (ID SEC N.º: 1045)	GGAUCUAGGCCACACUUCUTT (ID SEC N.º: 1487)	AGAAGUGUGGCCUAGAUCCTT (ID SEC N.º: 1929)	1,1
RAG3A-998	TCCTTCCTAATCTTGGGAG (ID SEC N.º: 1046)	UCCUCCUAAUCUUGGGAGTT (ID SEC N.º: 1488)	CUCCCAAGAUUAGGAAGGATT (ID SEC N.º: 1930)	1,1
RAG3A-387	GATAGGACTCCCTAGGGGA (ID SEC N.º: 1047)	GAUAGGACUCCCUAGGGGATT (ID SEC N.º: 1489)	UCCCCUAGGGAGUCCUAUCTT (ID SEC N.º: 1931)	1,1

[0164] Se puede apreciar claramente, a partir de la clasificación de la actividad de los 833 ARNap según sus posiciones dentro del promotor de *THPO*, que los ARNap funcionales están agrupados; es decir, en ciertas regiones del promotor, los ARNap funcionales se agruparon en regiones específicas de "punto caliente" (**FIGURA 11**). Como se muestra en la **FIGURA 11**, aparecieron 5 puntos calientes en la región (H1) de -1339 a -1044, en la región (H2) de -1027 a -903, en la región (H3) de -861 a -754, en la región (H4) de -728 a -611 y en la región (H5) de -593 a -1 del promotor, respectivamente, mostrando un alto grado de enriquecimiento de ARNap funcionales. Estos resultados indican que los ARNap funcionales no estaban distribuidos al azar en el promotor, sino que existían en las regiones específicas de punto caliente.

[0165] La secuencia de punto caliente H1 (5' a 3': -1339 a -1044) corresponde desde la posición 1 a la posición 296, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 601 del listado de secuencias:

```
1 caaacctca ccacctctc tcaactgcta gcctgcctcc ctacctctc
51 tctgaggtcg ctctcattc ttgtgttacc caggacaggg acctagccag
101 aaaccggcag cattccccct tctgtggagt gacagtatct cctctcatt
151 gtaacttata ctcaggcgca ttcgacagtc ccctttgtct ttctacccc
201 cttccttcac ccaagggacc ctctgcctct ccagcccact cccagcctcc
251 ttctcttgg ttcctgggc atgcctgcct ccctgtctcc tgtctc
```

[0166] La secuencia de punto caliente H2 (5' a 3': -1027 a -903) corresponde desde la posición 1 a la posición 125, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 602 del listado de secuencias:

```
1 ccactatcct cccagctatc ccagcacct ccttctaata cttgggagac
51 atctcgtctg gctggacggg aaaattccag gatctaggcc acacttctca
101 gcagacatgc ccatccttgg ggagg
```

[0167] La secuencia del punto caliente H3 (5' a 3': -861 a -754) corresponde desde la posición 1 a la posición 108, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 603 del listado de secuencias:

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

[0168] La secuencia del punto caliente H4 (5' a 3': -728 a -611) corresponde desde la posición 1 a la posición 118, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 604 del listado de secuencias:

```
1 ggaggtccag cagctgtctt tctaagaca gggacacatg ggcctggta
51 ttctcttgt cacatgtgga acggtaggag atggaagacg gagacagaac
101 aagcaaagga gggccctg
```

[0169] La secuencia del punto caliente H5 (5' a 3': -593 a -1) corresponde desde la posición 1 a la posición 593, de 5' a 3', de la ID. SEC. N.º: 605 del listado de secuencias:

```
1 gttagccat ctaagccact ggacccagc agacgagcac ctaagctcag
51 gcttaacca gtgcacgtgt gcgcacatac atgtgccccg cacctgacag
101 tccactcaac ccgtccaaac cctttcccca taacaccaac ccataacagg
151 agatttctct catgtgggca atatccgtgt tccacttcg aaagggggaa
```

201 tgacaagata ggactcccta ggggattaca gaaagaaaag caggaaagca
 251 agcatcctgt tggattcag cagcaggtat gatgtccagg gaaaagaaat
 301 ttggatagcc agggagtga aacccacca atcttaaaca agacctctgt
 351 gcttcttccc cagcaacaca aatgtctgc cagattctc ctggaaaaaa
 401 acttctgctc ctgtccccct ccaggtecca ggttgcccat gtccaggaaa
 451 agatggatcc ccctatcaa atcttctccg tgggtgtgtg ggggtggagga
 501 gtggacctg gtccaggcag ggggtccagg gaagagaagg cgtcacttcc
 551 gggggccttc accagtgtct ggtggctccc ttctctgatt ggg

Ejemplo 10: ARNap de *THPO* humano que promueve la expresión del ARNm de *THPO* en células humanas de cáncer hepático (HepG2)

(1) Cultivo y transfección de células

[0170] El cultivo de células se ha descrito en el ejemplo 9. Las células HepG2 (adquiridas en el Instituto de Ciencias Biológicas de Shanghai, TCHu119) se colocaron en una placa de 6 pocillos a razón de 2×10^5 células/pocillo. Siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se utilizó RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) para transfectar el ARNap de *THPO* humano a una concentración de 25 nM (a menos que se especifique lo contrario), y la duración de la transfección fue de 72 h. Cada tratamiento se realizó en 2 pocillos replicados.

(2) RT-qPCR de dos pasos

[0171] Tras la transfección, se descartaron los medios y se añadieron 500 µl de amortiguador de lisis celular a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. El ARN se extrajo con el kit Qiagen RNeasy, se transcribió en dirección inversa y se sometió a un análisis de qPCR en un sistema de PCR rápida en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems). Cada muestra se amplificó repetidamente en 3 pocillos replicados. Los sistemas de reacción de RT-PCR y qPCR se muestran en el ejemplo 5, Tablas 5-6, y los cebadores de amplificación se muestran en la Tabla 11. El *TBP* y el *HPRT1* sirvieron como controles internos, y el *THPO* se amplificó utilizando un par de cebadores de *THPO* F1/R1.

[0172] Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 30 s a 95 °C, 5 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, con 40 ciclos de amplificación.

[0173] Para calcular el valor de expresión (E_{rel}) del *THPO* (gen diana) de una muestra transfectada con ARNap en relación con el tratamiento control (simulación), se sustituyeron los valores Ct del gen diana y de dos genes de control interno en la fórmula 2 del ejemplo 3 para su cálculo.

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

Fórmula 2

[0174] La **FIGURA 12** muestra los valores de la expresión relativa del ARNm de *THPO* tras el tratamiento de las células con diferentes ARNap. La expresión relativa del ARNm del grupo de ARNip (RAG3A-365i) se reduce en un 85 % en comparación con el grupo control que utiliza un control de transfección testigo (simulación), lo que indica que el ARNip fue satisfactorio como transfección de ARN de interferencia pequeño control. Los valores de expresión relativa del ARNm de los grupos RAG3A-1219, RAG3A-1096, RAG3A-1308, RAG3A-1069 y RAG3A-851 fueron todos superiores a los del grupo control y aumentaron 1,8, 1,8, 1,6, 1,7 y 1,9, respectivamente. Los valores de expresión relativa del ARNm de los grupos RAG3A-541, RAG3A-1319, RAG3A-62, RAG3A-889 y RAG3A-787 fueron todos superiores a los del grupo control y aumentaron 2,5, 2,1, 2,9, 2,0 y 2,0, respectivamente. El efecto de activación de RAG3A-62 fue evidente y el valor de la expresión relativa del ARNm aumentó casi 3 veces. Esto indica que los ARNap activadores seleccionados al azar no solo pudieron ser transfectados con éxito a las células HepG2, sino que también pueden aumentar significativamente la expresión del ARNm de *THPO*.

Ejemplo 11: ARNap de *THPO* humano que promueve el nivel de expresión de la proteína THPO en células humanas de cáncer hepático (HepG2)

[0175] Los métodos de cultivo celular se han descrito en el ejemplo 9 y los métodos de transfección celular se han descrito en el ejemplo 10. Ensayo del nivel de la proteína THPO en el medio de cultivo de células HepG2 mediante el kit de ELISA

1) El estándar de proteína THPO humana se disolvió utilizando agua desionizada o agua destilada para obtener una solución madre de 20.000 pg/ml de estándar de proteína. Se añadieron 100 microlitros de solución madre de proteína THPO a 900 µl de diluyente de calibración RD6-11 (dilución 1:5) (para muestras de sobrenadantes de cultivos celulares) o diluyente de calibración RD6-11 (para muestras de suero/plasma) para obtener 2000 pg/ml de solución estándar, de los cuales se realizaron 7 diluciones en serie con el diluyente de calibración apropiado como estándar cero (0 pg/ml).

2) Se tomaron muestras de los sobrenadantes celulares y se centrifugaron para eliminar las células muertas y los residuos.

3) Se extrajo la cantidad adecuada de bandas de placas de micropocillos del bastidor de placas de micropocillos.

4) Se añadieron 50 µl de diluyente de ensayo RD1-1 a cada pocillo.

5) Se añadieron 200 µl de muestras estándar, control o de tratamiento a cada pocillo. La membrana se cubrió y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h.

6) El líquido se retiró de cada pocillo y se lavó 4 veces con 400 µl de amortiguador de lavado.

7) Se añadieron 200 µl de anticuerpo THPO humano a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

8) Se repitió la etapa 5.

9) Se añadieron 200 µl de solución de sustrato (reactivos de color A y B mezclados en volúmenes iguales y consumidos en 15 min) a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz.

10) Se añadieron 50 µl de solución de parada a cada pocillo y se mezclaron cuidadosamente.

11) Se determinó la absorbancia a 450 nM utilizando un lector de microplacas multifuncional (en 30 min).

[0176] La FIGURA 13 muestra el valor de expresión del nivel relativo de proteína de THPO en los medios de cultivo celular tras el tratamiento de las células con diferentes ARNap. La expresión proteica relativa del grupo de ARNip (DS3A-365i) se reduce en un 81 % en comparación con el grupo control que utiliza un control de transfección testigo, lo que indica que el ARNip fue satisfactorio como transfección de ARN de interferencia pequeño control. El nivel de expresión proteica relativa de THPO de los grupos RAG3A-723, RAG3A-892, RAG3A-62, RAG3A-1178, RAG3A-889, RAG3A-563, RAG3A-487 y RAG3A-787 fue superior al del grupo control y aumentó en 1,46, 1,26, 1,44, 1,31, 1,29, 1,32, 1,42 y 1,40, respectivamente. Esto indica que los ARNap activadores seleccionados al azar son capaces de promover la expresión de la proteína THPO a niveles de diferentes grados en las células HepG2.

[0177] Basándose en los resultados anteriores, se descubrió una variedad de ARNap capaces de activar notablemente la expresión de los genes *THPO/Thpo* humanos y de ratón mediante el cribado de alto rendimiento de los ARNap dirigidos a los promotores de los genes *THPO/Thpo* humanos y de ratón. Los solicitantes han comprobado en múltiples estudios que tanto los ARNap de ratón dirigidos al gen *Thpo* como los ARNap humanos dirigidos al gen *THPO* pueden introducirse eficazmente en las células mediante el sistema de liposomas utilizado en la presente invención y pueden regular al alza, significativamente, la expresión del gen *Thpo/THPO* y la proteína en las células a nivel del ARNm y de la proteína. En particular, los ARNap funcionales del gen *Thpo* del ratón aumentan, significativamente, la expresión del ARNm y de la proteína *Thpo* en el ratón y, simultáneamente, aumentan el número de plaquetas de manera significativa. Por lo tanto, el ARNap de *Thpo* de ratón y el ARNap de *THPO* humano de la presente invención pueden utilizarse para tratar una enfermedad o afección causada por una expresión insuficiente o disminuida de la proteína *Thpo/THPO* o una enfermedad o afección de diferente etiología, como la trombocitopenia, o en la preparación de un fármaco para tratar la enfermedad o afección mencionada.

Referencias

- 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. Stockklauser, 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.