



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112410336 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 202011264844.9

(22) 申请日 2015.05.27

(30) 优先权数据

62/004,239 2014.05.29 US

(62) 分案原申请数据

201580041391.4 2015.05.27

(71) 申请人 夸克制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·C·斯夸尔斯 S·埃尔利赫

D·罗森斯坦 N·莎伦

D·J·奥登海默 E·范斯坦

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

代理人 吕鹏云 尹吉伟

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书44页

序列表15页 附图4页

(54) 发明名称

用于预防器官中缺血再灌注损伤的方法和组合物

(57) 摘要

本发明在一些实施方式中涉及用于预防器官中缺血再灌注损伤(IRI)、尤其是35岁及以上的器官中IRI的化合物和方法。具体用途包括预防在体内的自体器官中、35岁及以上的供体器官的再植和移植中的IRI。另外的实施方式包括移植功能恢复延迟(DGF)的预防和死亡供体肾移植的接受者中透析的频率、数量和持续时间的减少。该方法需要在体内或离体将器官与暂时性p53抑制剂接触。进一步提供了新的暂时性dsNA p53抑制剂。

1.p53基因的暂时性抑制剂在制备用于预防面临缺血再灌注损伤(IRI)风险的肾的IRI的药物中的用途,所述IRI的预防提供急性肾损伤(AKI)的预防,其中所述暂时性抑制剂用于施用给35岁或以上具有面临IRI风险的肾的主体,其中所述面临风险的肾是所述主体的自体器官并且从来没有从所述主体的机体上移除;

其中所述p53基因的暂时性抑制剂是合成的小干扰核糖核酸(siRNA),其具有结构:

5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' 反义链(SEQ ID NO:37)

3' ACUUCCACUUUAUAAGAG 5' 正义链(SEQ ID NO:36)

其中,每一个A、C、U和G都是核糖核苷酸并且每一个连续的核糖核苷酸都通过共价键连接到下一个核糖核苷酸;并且

其中反义链和正义链中的替代核糖核苷酸均为2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸并且2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸出现在反义链的5'末端和3'末端并且未修饰的核糖核苷酸出现在正义链的5'末端和3'末端;或

其中所述p53基因的暂时性抑制剂是选自如下的双链核糖核酸(dsRNA):

dsRNA 化合物	正义 (N')y	反义 (N)x
	5->3	5->3
TP53_13_S2275	C3-CAGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACU-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGU <u>u</u> UCCA <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi
TP53_13_S2276	C3-CAGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACU-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGU <u>u</u> UCC <u>A</u> UAGGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi
TP53_13_S2277	C3-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGU <u>u</u> UCCA <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi
TP53_13_S2278	C3-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGU <u>u</u> UCC <u>A</u> UAGGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi
TP53_41_S709	GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT\$	AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$
TP53_41_S2279	C3-GACUCAGACUGAC <u>CAUUCU</u> U-C3-pi	5' phos-AAGAA <u>U</u> gU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3;C3-pi
TP53_41_S2298	C3-GACUCAGACUGAC <u>Auucuu</u> -C3-pi	5' phos-AAGAA <u>U</u> gU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3;C3-pi
TP53_41_S2299	C3-GACUCAGACUGAC <u>Auucuu</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAUgU <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3; C3-pi
TP53_41_S2300	C3-GACUCAGACUGAC <u>CAUUCU</u> U-C3-pi	5' phos-AAGAAUgU <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_44_S2301	C3-GGGCCUGACUCAGACugau-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUc <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2302	C3-GGGCCUGACUCAGACugau-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUcU <u>G</u> AGUCAGGCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2303	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUcU <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2304	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUcU <u>G</u> AGUCAGGCC-C3;C3-pi

其中:

A、U、G、C-代表未修饰的核糖核苷酸;

A、U、G、C-代表2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

a、u、c、g-代表通过2'-5'核苷酸间磷酸键连接至相邻核苷酸(5'>3')的核苷酸;

C3-代表1,3-丙二醇,单(磷酸二氢根),也识别为3-羟基丙基-1-磷酸帽部分[CAS RN: 13507-42-1];

C3-C3-代表两个连续的C3分子组成的帽部分;

dT-代表胸苷;

dT\$-代表没有末端磷酸的胸苷;

pi-代表3'-磷酸；

5'-phos-代表5'-磷酸。

2. 根据权利要求1所述的应用，其中所述具有面临IRI风险的肾的主体为45岁或以上。

3. 根据权利要求1或2所述的应用，其中所述主体已经做过心血管手术、心肺手术、肾脏手术、急性输尿管梗阻、休克、整体组织缺氧和/或暴露于肾毒素。

4. 根据权利要求3所述的应用，其中所述主体已经做过心血管手术、心肺手术和/或肾脏手术。

5. 根据权利要求4所述的应用，其中所述主体已经做过心血管手术。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述p53基因的暂时性抑制剂是合成的小干扰核糖核酸(siRNA)，其具有反义链SEQ ID NO:37和正义链SEQ ID NO:36，其中所述5'末端和3'末端是非磷酸化的。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述siRNA或所述dsRNA化合物是药学上可接受的盐的形式，特别是其中所述药学上可接受的盐为钠盐。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述p53基因的暂时性抑制剂以约1至约50mg/kg的剂量施用，例如以约10mg/kg的剂量施用。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述p53基因的暂时性抑制剂以包含药学上可接受的载体的液体组合物施用，特别是其中所述p53基因的暂时性抑制剂以包含药理学上可接受的水赋形剂的可注射组合物施用，任选地其中施用所述p53基因的暂时性抑制剂包括以下一者或多者：

- 所述p53基因的暂时性抑制剂通过静脉(IV)注射进行施用；
- 所述静脉(IV)注射以单治疗进行施用，其中所述单治疗包括单剂量或多剂量；
- 所述单治疗为单剂量；
- 所述单治疗为单静脉推注(IVP)；
- 所述静脉(IV)注射直接施用到中心静脉导管的近端或通过外围导管施用；
- 所述可注射组合物全身、皮下、局部、通过吸入、通过灌输(肺)进行施用。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述p53基因的暂时性抑制剂以脂质体或纳米粒进行接合或配制。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的应用，其中所述p53基因的暂时性抑制剂存在于包含所述抑制剂和使用说明的试剂盒中。

用于预防器官中缺血再灌注损伤的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日2015年5月27日、申请号201580041391.4、发明名称为“用于预防器官中缺血再灌注损伤的方法和组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请通过引用包含核苷酸和/或氨基酸序列,这些序列存在于命名为“262-PCT1_ST25.txt”的文件中,该文件大小为29kb,并且以IBM-PC数据格式(具有与MS-Windows的操作系统兼容性)创建于2015年5月27日并随本文一同提交。

技术领域

[0004] 本发明在一些实施方式中涉及用于预防器官中缺血再灌注损伤(IRI)、尤其是35岁及以上的器官中IRI的方法。具体用途包括预防在体内的自体器官中、35岁及以上的供体器官的再植和移植中的IRI。另外的实施方式包括移植物功能恢复延迟(delayed graft function (DGF))的预防和死亡供体肾移植的接受者中透析的频率、量和持续时间的减少。该方法需要在体内或离体将器官与暂时性p53抑制剂接触。进一步提供了新的暂时性dsRNA p53抑制剂。

背景技术

[0005] 缺血再灌注损伤

[0006] 缺血再灌注损伤(IRI)是当一段时间的缺血后血供给返回到组织对组织或器官引起的细胞损伤。缺血期间血氧和营养物的缺乏造成了一种状况,在该状况中血液循环的恢复导致了氧化性损伤,包括细胞功能障碍、凋亡和坏死。

[0007] IRI可能发生在任何身体组织中,作为尤其是手术、伤口、损伤、梗阻、植入和移植的结果。

[0008] 移植物功能恢复延迟

[0009] 移植物功能恢复延迟(DGF)是不利影响器官移植结果的一种重要的危险因素,所述器官移植包括肾移植,例如死亡供体肾移植(DDRT),尤其是在来自扩展标准供体(ECD)或来自具有持续的冷缺血时间的标准供体(SCD)的肾的接受者中。

[0010] UNOS肾移植登记数据库中超过138000个病例的分析揭示了:尽管短期急性排斥比率改善,长期移植物存活(>10年)还是保持不变(Takada M等;Transplantation.1997年12月15日;64(11):1520-5.)。对于包括在该回顾性调查中鉴定的差的移植物存活的较差的长期结果的主要成因之一是DGF。DGF被UNOS定义为在移植后的前七天内需要透析。DGF的病因学没有熟知但是无疑是多因素的,其中对由移植直接引起的移植物的IRI起到了重要作用。IRI是一种抗原独立性程序,如在动物模型中显示的,其是对于慢性同种异体移植功能障碍的发展的一种主要危险因素(Goes N等,Transplantation.1995 27;59(4):565-72;Kusaka M等,Transplantation.1999 67(9):1255-61;Takada M等;Transplantation.1997 64(11):1520-5)。移植之前在冷藏期间由减少的到肾的局部血流引起的缺血状况、跟随着在移植之后在血供应恢复之后的氧化应激引发了一连串可能导致

急性肾小管损害 (acute tubular injury) 的事件。肾小管细胞功能障碍和凋亡性细胞死亡是该程序的特点 (Oberbauer R等. J Am Soc Nephrol. 1999 10 (9):2006-13; Giral-Classe M等. Kidney Int. 1998 54 (3):972-8)。

[0011] 由于等待移植的申请者 and 可获得的供体器官的数量之间的悬殊增长, 来自扩展标准供体 (ECD) 的肾的使用已经增加了 (Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN), Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). 2008 OPTN/SRTR Annual Report: Transplant Data 1998-2007 [互联网]. Richmond (VA): Health Resources and Services Administration's Division of Transplantation (HRSA)/U.S. Department of Health & Human Services; 2009年10月7日 [2010年4月被引用])。

[0012] 美国专利号 6,593,353、6,982,277、7,008,956 和 7,012,087 涉及用于治疗癌症和其他疾病和紊乱的 p53 的暂时性抑制。

[0013] 给本申请的受让人的美国专利申请公布号 2006/0069056 涉及短的干扰 p53 分子和使用方法。

[0014] 给本申请的受让人的美国专利号 7,910,566 和 8,148,342 涉及用短的干扰 p53 分子分别治疗急性肾损伤 (AKI) 和急性肾衰竭 (ARF) 的方法。

[0015] 给本申请的受让人的 WO 2010/144336 涉及用 p53 抑制剂治疗患有由受到经常性肾损伤引起的慢性肾脏疾病 (CKD) 的主体的方法。

[0016] 给本申请的受让人的美国专利申请公布号 US 2010/0222409 和欧洲专利号 EP 2170403 涉及用下调 p53 基因表达的双链 RNA 化合物减少来自死亡供体的肾移植的接受者中移植物功能恢复延迟 (DGF) 的方法。

[0017] 给本申请的受让人的 PCT 专利申请号 PCT/US2013/059349 提供用于下调 p53 基因表达的修饰的双链核酸化合物。

[0018] 对于预防或减少自体 and 供体器官中缺血再灌注损伤的方法仍然有未满足的需要。

发明内容

[0019] 本发明部分基于惊奇的和临床显著的发现, 该发现为: 与更年轻的死亡供体肾的接受者和未治疗的患者相比, 用暂时性 p53 抑制剂治疗的 35 岁或以上的死亡供体肾的接受者在临床结果中显示了更大的改善。本发明人进一步惊奇地发现了 p53 基因的暂时性抑制剂在提供约 30 岁以上 (例如, 约 35 岁以上, 或约 40、45 或 50 岁以上) 并且包括来自扩展标准供体 (ECD) 和标准供体 (SCD) 的肾的 DGF 的预防中更有效。另外, 与未治疗的接受者相比, 用暂时性 p53 抑制剂治疗死亡供体肾的接受者导致移植后透析的量和持续时间减少。

[0020] 本发明的方面和实施方式描述于下文的说明书以及所附的权利要求中。

[0021] 根据第一个方面, 本文提供预防器官的缺血再灌注损伤 (IRI) 的方法, 包括将所述器官与有效提供所述器官中 IRI 的预防的量的暂时性 p53 基因抑制剂接触; 其中所述器官为 35 岁或以上。进一步提供在预防缺血再灌注损伤 (IRI) 中应用的 p53 基因的暂时性抑制剂, 其中所述抑制剂是用于接触 35 岁或以上的面临 IRI 风险的器官, 以及 p53 基因的暂时性抑制剂用于制造用于对缺血再灌注损伤 (IRI) 提供预防的药物的用途, 其中所述抑制剂是用于接触 35 岁或以上的面临 IRI 风险的器官。在其中器官面临 IRI 风险的所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中, 所述器官是主体的自体器官、再植器官或移植器官。

[0022] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,自体器官中IRI风险是由血流到所述器官的暂时中断或由所述器官的暂时整体组织缺氧促成的。血流的暂时中断是由于例如血栓、血管收缩、血管上的压力或从具有后续再植的主体的机体上移除所述器官中的至少一种。

[0023] 本发明在一些实施方式中涉及约30或34岁以上的器官;或约35岁以上的器官;或约36岁以上的器官;或约37岁以上的器官;或约38岁以上的器官;或约39岁以上的器官;或约40岁以上的器官;或约41岁以上的器官;或约42岁以上的器官;或约43岁以上的器官;或约44岁以上的器官;或约44岁以上的器官;或约46岁以上的器官;或约47岁以上的器官;或约48岁以上的器官;或约49岁以上的器官;或约50岁以上的器官;或约30或34岁以上的供体器官;或约35岁以上的供体器官;或约36岁以上的供体器官;或约37岁以上的供体器官;或约38岁以上的供体器官;或约39岁以上的供体器官;或约40岁以上的供体器官;或约41岁以上的供体器官;或约42岁以上的供体器官;或约43岁以上的供体器官;或约44岁以上的供体器官;或约44岁以上的供体器官;或约46岁以上的供体器官;或约47岁以上的供体器官;或约48岁以上的供体器官;或约49岁以上的供体器官;或约50岁以上的供体器官;或死亡的扩展标准供体(ECD)。另外,所述方法包括从供体移除后并且在移植前通过冷藏已经被完整保存的器官。

[0024] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述移植器官来自死亡供体。在多种实施方式中,将所述器官与所述暂时性抑制剂接触包括将所述暂时性抑制剂施用于具有面临IRI风险的器官的主体。所述面临风险的器官可以是主体的自体器官并且从未从主体的机体中移除过。或者,所述面临风险的器官已经被再植到主体或移植到主体。

[0025] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,将所述器官与所述暂时性抑制剂接触包括在将所述器官移植或再植到接受者之前离体将所述器官与所述暂时性抑制剂接触。

[0026] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述面临IRI风险的器官是45岁或以上。

[0027] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,IRI的预防引起IRI相关的器官功能障碍的预防或IRI相关的移植物功能恢复延迟的预防。

[0028] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述器官选自由肾、肝、胰、心脏、肺、肠、皮肤、血管、脑、视网膜、复合组织、血管、耳、肢体或其部分组成的组。在一些实施方式中,所述器官为肺、心脏或肾,优选为肾。

[0029] 在所述方法、抑制剂或用途的多种实施方式中,所述器官是肾移植物并且其中IRI的预防引起移植物功能恢复延迟(DGF)的预防。所述DGF的预防引起接受死亡供体肾移植的依赖透析的末期肾脏疾病(ESRD)患者在移植后的至少前7天期间透析支持的量、强度和持续时间的减少。在一些实施方式中,所述DGF的预防引起移植和移植后第一次透析治疗之间的更长的时间间隔、透析的最初移植后进程的更短的平均持续时间和移植后第一个月末期的更高的测定的肾小球过滤率(mGFR)中的至少一种。

[0030] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,IRI的预防引起接受死亡供体肾移植的依赖透析的末期肾脏疾病(ESRD)患者在移植后的前30天、前60天、前120天和多至前180天期间的透析支持的量、强度和/或持续时间的减少。

[0031] 在所述方法、抑制剂或用途的各种实施方式中,所述器官(例如肾)从供体移除后并且在移植到接受者中之前通过冷藏完整保存。

[0032] 在所述方法、抑制剂或用途的多种实施方式中,所述器官(例如肾)从供体移除后并且在移植到接受者中之前通过机器灌注至少一部分时间进行保存。

[0033] 在供体肾的IRI的预防的方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述方法进一步包括步骤:(a)选择具有来自死亡的扩展标准供体的肾的接受者,和(b)施用给所述接受者有效提供接受者中DGF的预防的量的p53基因的暂时性抑制剂。在一些实施方式中,所述肾来自非死亡的扩展标准供体的供体。在替代的实施方式中,所述肾来自50至59岁(包括)之间的供体,该供体不具有下述中的至少两种:高血压历史、末端血清肌酐水平大于1.5mg/dl或脑死亡的心血管起因。在一些实施方式中,所述肾来自不大于60岁的供体。

[0034] 在所述方法、抑制剂或用途的进一步的实施方式中,IRI的预防提供急性肾损伤(AKI)的预防,其中AKI由心血管手术、心肺手术、肾手术、急性输尿管梗阻、休克、整体组织缺氧和/或暴露于肾毒素中的至少一种引起。

[0035] 在第二个方面,本文提供预防来自死亡供体的供体肾中缺血再灌注损伤的方法,包括将所述肾与有效提供所述肾中IRI的预防的量的p53暂时性抑制剂接触。进一步提供在预防来自死亡供体的供体肾中缺血再灌注损伤(IRI)中应用的p53的暂时性抑制剂,其中所述抑制剂用于接触所述肾。进一步提供p53基因的暂时性抑制剂在制造用于提供预防来自死亡供体的供体肾中缺血再灌注损伤(IRI)的药物中的用途,其中所述抑制剂用于接触所述肾。

[0036] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,IRI的预防引起接受死亡供体肾移植的依赖透析的末期肾脏疾病(ESRD)患者在移植后的前180天期间透析支持的量、强度和持续时间的减少。

[0037] 在上文公开的方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述p53基因的暂时性抑制剂选自由小的有机分子、蛋白、抗体或其片段、肽、多肽、肽模拟物和核酸分子组成的组,或为其药学上可接受的盐或其前药。p53基因的暂时性抑制剂可以是核酸分子,该核酸分子选自由单链反义核酸(ssNA)、双链NA(dsNA)、小干扰NA(siNA)、短发夹NA(shNA)、微小RNA(miRNA)、适体和核酶组成的组,或为其药学上可接受的盐或其前药。所述核酸分子可以是修饰的或化学修饰的。在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述核酸分子是ssNA或dsNA,其包括一种或多种修饰的核苷酸、未修饰的核苷酸、核苷酸类似物和非常规部分。

[0038] 在所述方法、抑制剂或用途的一些优选的实施方式中,所述dsNA选自由未修饰的dsNA或化学修饰的dsNA组成的组,或为其盐或其前药。在一些实施方式中,所述dsNA含有具有表2所示的核酸序列的反义链(SEQ ID NOS:21-33、35、37)。在多种实施方式中,所述dsNA含有反义链序列5' UGAAGGGUGAAUAUUCUC 3'和正义链序列5' GAGAAUAUUCACCCUUCA 3'。

[0039] 在所述方法、抑制剂或用途的一些具体的实施方式中,所述dsNA分子是合成的小干扰核糖核酸(siRNA),其具有结构:

[0040] 5' UGAAGGGUGAAUAUUCUC 3' (反义链) (SEQ ID NO:37)

[0041] 3' ACUUCCCACUUUAUAAGAG 5' (正义链) (SEQ ID NO:36)

[0042] 其中,每一个A、C、U和G都是核糖核苷酸并且每一个连续的核糖核苷酸都通过共价

键连接到下一个核糖核苷酸;并且

[0043] 其中反义链和正义链中的替代核糖核苷酸均为2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸,并且2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸出现在反义链的5'末端和3'末端,并且未修饰的核糖核苷酸出现在正义链的5'末端和3'末端。所述dsNA可以是在5'末端和或3'末端中的一个或多个处末端磷酸化或非磷酸化的。在一些实施方式中,所述dsNA是在5'末端和3'末端处非磷酸化的。所述dsNA分子优选是以药学上可接受的盐(例如钠盐)的形式。

[0044] 在上文公开的所述方法、抑制剂或用途的多种实施方式中,所述IR损伤的预防提供其中p53基因的暂时性抑制剂以约1.0mg/kg至约50mg/kg,优选约10mg/kg的剂量施用的预防。

[0045] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述p53基因的暂时性抑制剂被配制为组合物。在一些实施方式中,所述暂时性抑制剂可以以包含药学上可接受的载体的液体组合物施用。

[0046] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述组合物进一步包含细胞靶向部分。所述细胞靶向部分可以共价或非共价连接到p53基因的暂时性抑制剂。

[0047] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述暂时性抑制剂以可注射的组合物施用给所述接受者,所述可注射的组合物包含药理学上可接受的水赋形剂。所述暂时性抑制剂可以通过静脉(IV)注射施用。所述静脉(IV)注射以单治疗施用,所述单治疗可以是单剂量或多剂量。在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述单治疗为单剂量或多剂量,优选单剂量。所述单治疗例如为单次静脉推注(IVP)。

[0048] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述静脉(IV)注射是在自体移植/再植或同种异体移植/移植再灌注之后在手术当中施用。所述静脉(IV)注射直接施用到中心静脉导管的近端或通过外围导管施用。

[0049] 所述暂时性抑制剂的施用方式和剂量由主治医生或医院的工作人员决定,并且将根据包括主体的器官、指征、整体健康和年龄的多种因素决定。在一些实施方式中,所述暂时性抑制剂全身、皮下、局部、通过吸入、通过灌输(肺)施用。取决于目标器官,所述暂时性抑制剂可以例如以脂质体、脂质体复合物(lipoplex)、微粒或纳米粒进行接合或配制。

[0050] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,其中所述接受者接受了来自供体的器官,给所述接受者进一步被施用药物,所述药物选自抗病毒剂、抗真菌剂、杀菌剂、免疫抑制剂和其任意组合组成的组。在一些实施方式中,所述药物是为钙调磷酸酶抑制剂的免疫抑制剂。在多种实施方式中,所述免疫抑制剂选自他克莫司(TAC)、吗替麦考酚酯(MMF)、麦可酚酸(MPA)、皮质类固醇、环孢霉素、咪唑硫嘌呤、西罗莫司和其任意组合组成的组。在一些实施方式中,所述免疫抑制剂为他克莫司(TAC)。所述接受者可以(例如围手术期和移植再灌注之前进一步被施用抗体诱导治疗剂。在多种实施方式中,所述抗体诱导治疗剂包括多克隆抗胸腺细胞球蛋白(ATG)或抗CD25(抗-IL-2R)单克隆抗体。

[0051] 在所述方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述抑制剂存在于包含抑制剂和使用说明的试剂盒中。例如,所述抑制剂以液体或固体形式存在于容器内。所述试剂盒可以进一步包括稀释剂和/或用于施用的工具,例如注射器。

[0052] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供在预防肾移植的接受者中移植物功能恢复延迟中应用的p53基因的抑制剂,其中所述接受者接受了来自具有肾供体风险指数

(KDRI) 至少为1.25的供体的肾。根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供p53基因的抑制剂在制备用于提供预防肾移植接受者中DGF的药物中的用途,其中所述接受者接受了来自具有肾供体风险指数(KDRI)至少为1.25的供体的肾。

[0053] 在本文所述的方法、抑制剂或用途的一些实施方式中,所述肾来自具有KDRI至少为1.50、至少为1.75、至少为2.0或甚至至少为2.5的供体。在一些实施方式中,所述肾来自具有从 1.25至1.50、1.5-1.75、1.75-2.0、2.0-2.5或甚至2.5-3.0范围的KDRI的供体。

[0054] 在一些实施方式中,所述肾来自具有肾供体信息指数(Kidney Donor Profile Index (KDPI)) 至少为70%的供体。在一些实施方式中,所述KDPI大于75%、大于80%或甚至大于85%。

[0055] 在一些实施方式中,所述死亡供体肾从供体移除后并且在移植到接受者中之前通过冷藏完整保存。

[0056] 在一些实施方式中,所述死亡供体肾从供体移除后并且在移植到接受者中之前通过机器灌注至少一部分时间保存。

[0057] 在一些实施方式中,预防移植物功能恢复延迟的结果包括延长的至第一次移植后透析的时间、移植后透析的更短的平均次数和持续时间和在移植后第一个月期间提高的测定的肾小球过滤率(mGFR)中的至少一种。

[0058] 在一些实施方式中,所述死亡ECD供体至少为约60岁。

[0059] 在一些实施方式中,所述死亡ECD供体至少为约50岁,所述供体具有至少两种状况,所述状况选自由高血压历史、末端血清肌酐水平约1.5mg/dL以上和作为死亡原因的心血管事故组成的组。

[0060] 除非另外定义,本文所用的所有科技术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的一样的含义。如果有矛盾,以本说明书(包括定义)优先。

[0061] 如本文使用的,术语“包含”、“包括”、“具有”和其语法变型是用作说明陈述的特征、整数、步骤或组分但是并不排除添加一个或多个另外的特征、整数、步骤、组分或其组。这些术语包括术语“组成”和“基本组成”。

[0062] 如本文使用的,不定冠词“一种”和“一个”意指“至少一种(个)”或“一种(个)或多种(个)”,除非上下文清楚地表明其它含义。

[0063] 如本文使用的,术语“扩展标准供体(ECD)”指60岁以上的肾供体,或50至59岁(包括)之间的供体,该供体具有下述中的至少两种:高血压史、末端血清肌酐水平大于1.5mg/dl 或脑死亡的心血管起因。

[0064] 如本文使用的,“标准供体(SCD)”是50岁以下并且遭受来自任何数量起因的脑死亡的供体。这将包括50岁以下遭受外伤或其他医疗问题(比如中风)的供体。儿科供体被认为是标准供体;或50至59岁(包括)之间的没有下述两种或多种的供体:高血压史、末端血清肌酐水平大于1.5mg/dl,或脑死亡的脑血管起因。

[0065] 如本文使用的,术语“移植物功能恢复延迟(DGF)”指在肾转移后的7天内需要透析支持,不包括移植后24小时内失败的同种异体移植。

[0066] 如本文使用的,如在http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/Kidney_Proposal_FAQ.pdf上由美国器官获取和移植网络定义的,术语“肾供体风险信息(KDRI)”指与中值(第50个百分点)供体相比,来自特定死亡供体的移植后肾移植失败(平

均,成人接受者)的相对风险。

[0067] 如本文使用的,如在http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/Kidney_Proposal_FAQ.pdf上由美国器官获取和移植网络定义的,术语“肾供体信息指数(KDPI)”指肾移植后移植失败的风险。

[0068] 如本文使用的,术语“预防”DGF指预防或减少透析支持的强度和持续时间,例如,如移植和移植后第一次透析治疗之间的更长的时间间隔、透析的最初移植后进程的更短的平均持续时间或移植后第一个月末期的更高的测定的肾小球过滤率所显示的。

[0069] 如本文使用的,除非另外说明,化合物或分子(即暂时性抑制剂)的“治疗有效量”是足够在治疗或处理与p53增加的表达相关的紊乱中提供治疗益处或延迟或最小化一种或多种与p53增加的表达相关的紊乱相关的症状的量。

[0070] 如本文使用的,除非另外说明,化合物(即抑制剂)的“预防有效量”是足够预防、延迟与p53增加的表达相关的紊乱的发作或减少与p53增加的表达相关的紊乱的严重度,或一种或多种与p53增加的表达相关的紊乱相关的症状或预防或延迟其反复的量。

[0071] 如本文使用的,术语“冷藏”指在约0℃或更低的温度下贮藏,例如,在冰上贮藏。这种贮藏减少了(例如,由器官的)能量消耗速率。

[0072] 如本文使用的,术语“机器灌注”指连同保存溶液通过肾的血管的泵驱动循环,在低于正常体温下贮藏。这种灌注有助于维持或补充残余的、细胞内能量储存同时也减少了它们被消耗的速率。

[0073] “35岁及以上的器官”指存在于其原生宿主、再植到其原生宿主、从供体移除或移植到接受者的机体器官,例如,肾、肝、胰、心脏、肺、肠、皮肤、血管、脑、视网膜、复合组织、血管、耳、肢体或其部分,其中年龄从宿主或供体出生开始计算。

[0074] “预防缺血再灌注损伤(IRI)的方法”指预防、减弱或减少由IRI引起的损害,例如,预防、减弱或减少细胞死亡和/或凋亡和/或坏死和/或氧化应激。

[0075] 如本文使用的,“面临IRI风险的器官”指经历血流的暂时中断或暂时整体组织缺氧的器官。在非限制性实例中,血流的暂时中断可能是由于任何原因的血栓、血管收缩和血管上的压力或跟随再植或移植的从机体上移除所述器官导致的。

[0076] 如本文使用的,“移植物功能恢复延迟”或“DGF”指器官移植后的器官功能障碍。当涉及肾移植时,根据UNOS,DGF被定义为移植后前7天内需要透析。

[0077] 如本文使用的,当涉及肾移植时,术语“预防”DGF指预防或减少透析支持的频率和/或持续时间,例如,如由移植和移植后第一次透析治疗之间的更长的时间间隔、透析的最初移植后进程的更短的平均持续时间或移植后第一个月末期的更高的测定的肾小球过滤率所显示的。

[0078] p53的暂时性抑制剂

[0079] p53的暂时性抑制剂指降低例如p53基因在器官上或主体中足以引起治疗或预防效果的时间长度的表达或功能,而不增加癌变的风险。暂时性p53抑制的方法,除其他外,公开于美国专利号6,593,353、6,982,277、7,008,956和7,012,087,它们的整体通过引用并入本文。

[0080] 如本文使用的术语“抑制剂”指一种化合物,其能(部分或全部地)降低基因的表达或这种基因的产物(mRNA、蛋白)的活性到一种足以实现期望的生物学或生理学作用的程

度。例如,所述表达可以降低到90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或少于不存在抑制剂下观察到的。优选地,所述抑制剂是可逆地降低p53表达或活性的暂时性抑制剂。

[0081] p53的“暂时性”抑制剂指发挥其作用上至24小时、上至36小时、上至48小时、上至72小时、上至96小时、上至120小时或不长于120小时、7天、10天、20天或30天的分子。

[0082] “p53基因”的抑制剂可以是小的有机分子、蛋白、抗体或其片段、肽、多肽、肽模拟物或核酸分子或药学上可接受的盐或其前药。

[0083] 小的有机分子可以是例如皮斐松(pifithrin)。

[0084] 如本文使用的“核酸适体”指特异结合到靶分子上的核酸分子,其中所述核酸分子具有包含(优选在体内)被所述靶分子识别的序列的序列。所述靶分子可以是任何感兴趣的分子。例如,所述适体可以用于结合蛋白的配体结合域,从而预防自然存在的配体与所述蛋白的相互作用。

[0085] 术语“抗体”,除其他外,指IgG、IgM、IgD、IgA和IgE抗体。该定义包括多克隆抗体或单克隆抗体。该术语指包含抗原结合域是整个抗体或抗体的片段,例如没有Fc部分的抗体、单链抗体、微抗体、主要由仅仅是所述抗体的可变的、抗原结合域组成的片段,等等。术语“抗体”也可以指针对通过cDNA接种获得的多聚核苷酸序列的抗体。该术语也包括保留与它们的抗原选择性结合能力的抗体片段,例如p53基因产物,并且(除其他外)举例如下:

[0086] (1) Fab,其是含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,其可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体以得到轻链和重链的一部分而制备得到;

[0087] (2) (Fab')₂,可以通过用胃蛋白酶处理完整抗体而没有后续还原所得到的抗体片段;F(ab')₂是通过两个二硫键结合在一起的两个Fab片段的二聚物;

[0088] (3) Fv,被定义为含有以两条链表达的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段;和

[0089] (4) 单链抗体(SCA),被定义为含有由合适的多肽连接子连接的轻链可变区和重链可变区的作为基因融合的单链分子的基因工程分子,包括scFv。

[0090] 可以进行CDR嫁接以改变包括亲和性或特异性的抗体分子的特定性质。CDR嫁接的非限制性实例公开于美国专利号5,225,539。

[0091] 单域抗体分离自免疫的骆驼科(包括骆驼和骆马(llama))的独特的重链抗体。小抗体是非常活跃的并且以单体状态以高的亲和性结合抗原。美国专利6838254描述了起源于骆驼科的重链免疫球蛋白的抗体或其片段的制备。

[0092] 单克隆抗体(mAb)是与特定的抗原实质上同源的抗体群,并且在本领域中是公知的。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法获得。

[0093] mAb可以是包括IgG、IgM、IgE、IgA的任何免疫球蛋白类别,并且可以是其任何子类。可以在体外或体内培养产生mAb的杂交瘤。高滴度的mAb在体内获得,例如其中将来自个体杂交瘤的细胞向腹膜内注射到pristine激发的Balb/c小鼠以制备含有高浓度的期望的mAb的腹水。可以使用本领域技术人员公知的柱层析方法从这种腹水或从培养上清中纯化同种型IgM或IgG的mAb。

[0094] “特异性结合亲和性”是指抗体以与其在类似条件下结合到另一种多肽相比更大的亲和性结合到p53多肽或其片段。

[0095] 术语“表位”意指能被抗体结合的分子部分,其也可以被该抗体识别。“抗原”是能被抗体结合的分子或分子部分,其另外能够诱导动物以产生能够结合该抗原的表位的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。上面所指的特异性反应意指抗原会以高度选择性方式与其对应的抗体反应,而不与大量的可以由其他抗原引起的其他抗体反应。

[0096] 表位或抗原决定簇通常由分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面群组成并且具有特定的三维结构特性以及特定的带电特性。

[0097] 所述抗体可以是人或非人抗体。非人抗体可以通过重组方法人源化的以减少在人中的免疫原性。人源化抗体的方法对于本领域技术人员来说是已知的。

[0098] mAb或其片段、嵌合体或人源化抗体本身可以用作p53基因产物的抑制剂,或可以用于接合p53基因的暂时性抑制剂。当接合到p53基因的暂时性抑制剂时,所述抗体可以用于靶向面临IRI风险的器官。

[0099] 如本文所用的,术语“肽”泛指肽、蛋白、蛋白的片段等等。本领域技术人员会意识到本文公开的肽可以被合成为肽类似物。肽类似物或“肽模拟物”是模拟肽的生物活性而实际上不完全是肽的分子。如本文使用的术语“肽模拟物”指具有肽活性的肽样分子,其结构上基于所述肽。这种肽模拟物包括化学修饰的肽、含有非自然产生的氨基酸的肽样分子和肽,并且具有例如所述肽模拟物来源的肽的选择性靶向活性的活性。肽模拟物可以包括氨基酸类似物,并且可以是肽样分子,所述肽样分子含有例如酰胺键等排物(例如逆反(retro-inverso)修饰)、还原的酰胺键、亚甲基硫醚或亚甲基亚砷键、亚甲基醚键、乙烯键、硫代酰胺键、反式烯烃或氟烯烃键、1,5-二取代四唑环、酮亚甲基或氟酮亚甲基键或另一个酰胺等排物。本领域技术人员理解这些和其他肽模拟物包含在如本文使用的术语“肽模拟物”的意思内。肽、蛋白或其片段本身可以用作p53基因产物的抑制剂,或可以用于接合p53基因的暂时性抑制剂。当接合到p53基因的暂时性抑制剂时,所述肽可以用于靶向促进将所述抑制剂递送到面临IRI风险的器官。

[0100] 如本文使用的,“组合物”或“治疗性组合物”指一种或多种活性组分与其他成分(例如药学上可接受的载体或赋形剂)的制剂。治疗性组合物的目的是促进将活性组分施用到主体。

[0101] 术语“药学上可接受的载体”指不引起对主体的显著刺激并且不实质上消除所施用的活性组分的活性和性质的载体或赋形剂。在这些说法下包含佐剂。术语“赋形剂”指加入到治疗性组合物中以进一步促进活性组分的施用的惰性物质。

[0102] 用于实施本文的教导的治疗性组合物可以用本领域普通技术人员熟悉的技术以使用一种或多种药学上可接受的载体的传统方式配制,所述药学上可接受的载体包括赋形剂和佐剂,所述赋形剂和佐剂促进处理活性组分成为治疗性组合物,并通常包括将一定量的活性组分与其他成分混合。合适的技术描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co., 埃斯顿,美国宾夕法尼亚州,最新版,其通过引用的方式并入本文。例如,用于实施本文的教导的治疗性组合物可以通过一种或多种本领域公知的工艺制造,例如,混合、调和、均质化、溶解、成粒、乳化、封装、捕获和冻干工艺。

[0103] 适于实施本文的教导的治疗性组合物包括包含有效量的以实现预期目的(治疗有效量)的活性组分的组合物。治疗有效量的确定是完全在本领域技术人员的能力内的,例如,最初是从动物模型评估的。

[0104] 联邦法要求药物组合物在人类治疗中的用途要被联邦政府机构许可。在美国,执行是食品和药物管理局的责任,食品和药物管理局颁布合适的条例用于保护这种许可,这在21U.S.C. 第301-392部分有详述。对于大多数国家来说要求类似的许可。条例在国家和国家之间不同,但是个别的程序对于本领域技术人员来说是公知的并且本文提供的组合物和方法优选相应地遵从。

附图说明

[0105] 参考附图本文描述了本发明的一些实施方式。说明书连同附图使本领域普通技术人员明白本发明的一些实施方式可以如何实行。

[0106] 在图中:

[0107] 图1为显示了在来自年幼和年老大鼠供体的肾中由缺血引起的p53活化的蛋白水平的图。

[0108] 图2a和2b为显示在mITT (EE) 群 (图2a) 和ECD/CS层 (图2b) 中至移植后第一次透析的二级终点时间的线图。

[0109] 图3显示了表明在每种供体肾类型的移植物接受者中QPI-1002治疗DGF相对风险减少上的影响的森林图。

具体实施方式

[0110] 本文提供暂时性抑制p53基因的化合物和组合物,以及这种化合物用于预防器官中IRI、死亡供体肾移植接受者中透析的量和持续时间的减少和用于预防扩展标准供体(ECD)肾的接受者中移植物功能恢复延迟(DGF)中的用途。

[0111] p53的暂时性抑制剂

[0112] p53的暂时性抑制剂意于降低p53基因例如在器官或主体中足以引起治疗或预防效果的时间长度的表达或功能,而不增加癌变的风险。暂时性p53抑制的方法,除其他外,公开于美国专利号6,593,353、6,982,277、7,008,956和7,012,087,它们的整体通过引用并入本文。

[0113] 如本文使用的术语“抑制剂”指一种化合物,其能(部分或全部地)降低基因的表达或这种基因的产物(mRNA、蛋白)的活性到一种足以实现期望的生物学或生理学作用的程度。例如,所述表达可以降低到90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或少于不存在抑制剂下观察到的。优选地,所述抑制剂是可逆地降低p53表达或活性的暂时性抑制剂。

[0114] p53的“暂时性”抑制剂指发挥其作用上至24小时、上至36小时、上至48小时、上至72小时、上至96小时、上至120小时或不长于30天的分子。

[0115] “p53基因”的抑制剂可以是小的有机分子、蛋白、抗体或其片段、肽、多肽、肽模拟物或核酸分子或药学上可接受的盐或其前药。

[0116] 小的有机分子可以是例如皮斐松。

[0117] p53基因的抑制剂可以是“适体”,所述适体是结合到特异性蛋白靶标分子的核酸或肽分子(参见,例如,专利文件:Sundaram,等,Eu.J.Pharm.Sci.2013,48:259-271;W01992/014843;美国专利号5,861,254、5,756,291、6,376,190)。

[0118] 适体可以用于抑制靶基因或将其他抑制剂靶定至特异性靶细胞或器官(参见例如US 2006/0105975)。

[0119] 适体意为包括“硫代磷酸寡核苷酸适体”、“硫代适体”或“TA”,其是一类结构上不同于能以高(nM)亲和性结合蛋白的RNA和DNA的配体。TA也可以用于抑制靶基因或本身作为靶向部分。

[0120] 在某些优选的实施方式中,下调或抑制p53基因表达的化合物是结合编码p53的核苷酸序列(例如mRNA序列)或其部分(例如,对于人p53的编码序列(SEQ ID NO:1-7),编码一个或多个蛋白或蛋白亚基的mRNA)的核酸分子(例如,反义分子、小干扰核酸(siNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链NA(dsNA)、微小RNA(miRNA)或小发夹RNA(shRNA))。在多种实施方式中,所述核酸分子选自自由下调p53基因表达的未修饰的或化学修饰的dsNA 化合物(例如dsRNA、siRNA或shRNA)组成的组。

[0121] 在一些实施方式中,所述核酸分子是下调p53表达的合成的、未修饰的双链RNA(dsRNA) 化合物。

[0122] 在一些优选的实施方式中,所述核酸分子是下调p53表达的合成的、化学修饰的双链RNA(dsRNA) 化合物。在一些优选的实施方式中,“p53”指人p53基因。在一些优选的实施方式中,“靶基因”指人p53基因。

[0123] 本文提供的化学修饰的核酸分子和组合物显示有益的性质,包括当与对应的未修饰的核酸分子相比时,增加的血清稳定性、提高的细胞摄取、降低的脱靶活性、降低的免疫原性、提高的内含体释放、提高的到靶组织或细胞的特异性传送和增加的敲除/下调活性中的至少一种。

[0124] 核酸化合物

[0125] 在本文公开的语境中,术语“核酸化合物”或“核酸分子”指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其组合的寡聚体(寡聚核苷酸)或多聚体(多聚核苷酸)。该术语包括由自然产生的核碱基、糖和共价的核苷间连接组成的化合物。

[0126] “dsRNA”是包括RNA和RNA类似物的小的双链核酸分子。“dsNA”是包括RNA、修饰的核苷酸和/或非传统核苷酸的小的双链核酸分子。术语dsRNA和dsNA可以交替使用。

[0127] 术语“dsRNA”涉及由碱基配对连接在一起的两条链的反向平行的多聚核糖核酸。所述两条链可以是相同长度或不同长度,条件是所述两条链之间具有足够的序列同源性,使得双链结构在整个长度上以至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的互补性形成。根据一种实施方式,对于dsRNA分子没有核苷酸悬垂。根据另一种实施方式,所述 dsRNA分子包含悬垂,所述悬垂可以选自核苷酸悬垂、非核苷酸悬垂或其组合。根据另外的实施方式,所述链是对齐的,这样至少在所述链的末端具有1-10个碱基,优选1-6个碱基没有对齐,使得当链退火时,二联体的一端或两端出现1-10个残基的悬垂。

[0128] 在一些实施方式中,本申请的dsRNA在15至100bp之间、15至50bp之间、15至40bp之间、15至30之间或15至25bp之间。

[0129] 在进一步的实施方式中,所述dsRNA的正义链和/或反义链的5' 和/或3' 端包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多核苷酸悬垂。在一些实施方式中,所述dsRNA包括正义链和/或反义链的5' 和/或3' 端的1-6个核苷酸悬垂。在另一个实施方式中,所述dsRNA的两端是平末端。

[0130] 术语“siRNA”涉及可以与RNA干扰(RNAi)组织相互作用并且诱导RNAi途径的小的抑制性dsRNA(一般在15-25bp之间)。典型地,siRNA是化学合成的15-25mer,优选包含中心15-19bp二联区域,在末端上具有或不具有对称的2-碱基或多余的3'悬垂。

[0131] 双链干扰RNA(例如siRNA和shRNA)的链可以连接以形成发夹或茎环结构(例如shRNA)。因此,如所述的本发明的一些实施方式的RNA沉默剂也可以是小发夹RNA(shRNA)。

[0132] 如本文使用的,术语“shRNA”指具有茎环结构的RNA分子,其包括互补序列的第一和第二区域,所述区域的互补和定位程度足够使得在所述区域之间发生碱基配对,所述第一和第二区域足够使得在所述区域之间发生碱基配对,所述第一和第二区域以环区域结合,所述环由环区域内核苷酸(或核苷酸类似物)之间的碱基配对缺失引起。

[0133] 如本文使用的,术语“修饰的核苷酸”指包含至少一种修饰的核苷酸,所述修饰可以是糖修饰、核碱基修饰或核苷酸间连接修饰(所述核苷酸和连续的核苷酸之间)或其组合。由于期望的性质,例如,比如,提高的细胞摄取、提高的对核酸靶标的亲和性和提高的核酸酶稳定性,这种修饰的核苷酸常常比自然产生的形式更优选。

[0134] 核苷酸间连接修饰:组成RNA和DNA的骨架的自然产生的核苷间连接是3'到5'磷酸二酯连接。根据本发明的一些实施方式,所述核酸化合物可以包括至少一个修饰的(非自然产生的)核苷酸间连接。修饰的核苷间连接可以包括保留磷原子的核苷间连接和不具有磷原子的核苷间连接。

[0135] 其中含有磷原子的修饰的核苷间连接的非限制性实例包括例如这些具有普通3'-5'连接、2'-5'连接的类似物的硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基和其它烃基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯、5'-丙炔基磷酸酯和手性磷酸酯)、磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨烷基氨基磷酸酯)、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基磷酸酯、硫羰基磷酸三酯、磷乙酸(PACE)和硫代磷酸乙酯、硒磷酸和boranophosphate,以及具有其中一个或多个核苷酸间连接是3'到3'、5'到5'或2'到2'连接的反转的极性的那些。

[0136] 其中不包括磷原子的修饰的核苷酸间连接的非限制性实例包括短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接、或一种或多种短链杂原子或杂环核苷间连接。这些包括具有吗啉基连接(部分从核苷的糖部分形成),硅氧烷连接,硫化物、亚砷和砷连接、formacetyl和硫代formacetyl连接、亚甲基formacetyl和硫代formacetyl连接、riboacetyl连接、含有烯烃的连接、氨基磺酸盐连接、亚甲基亚氨基(methyleneimino)和亚甲基胍基(methylenehydrazino)连接、磺酸盐和磺胺连接、酰胺连接和其他具有混合的N、O、S和CH₂成分部分的连接。

[0137] 杂原子核苷间连接的非限制性实例包括-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (被称为亚甲基(甲亚氨基)或MMI连接)、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-和-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (其中自然产生的磷酸二酯核苷酸间连接表示为-O-P(=O)(OH)-O-CH₂-)。

[0138] 糖修饰:本文公开的核酸化合物中的糖部分可以包括没有任何修饰的2'-羟基戊呋喃糖部分。或者,本发明的核酸化合物可以含有一个或多个取代的或其它修饰的糖部分。对于糖取代基团优选的位置是不通常用于天然的3'到5'核苷间连接的2'位置。其他优选的位置是3'和5'末端。当两个相邻的糖单元之间的连接是2'-5'连接时,3'糖位置是对修饰开放的。优选的糖取代基团包括:-OH;-F;-O-烷基;-S-烷基或-N-烷基;-O-烯基;-S-烯基或-

N-烯基; -O- 炔基、-S-炔基或-N-炔基; 或-O-烷基-O-烷基, 其中所述烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基、C1至C10较低级的烷基、取代的较低级的烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基 (例如-丙炔基、-丙基、-乙炔基、-乙烯基和丙烯基)。糖修饰的非限制性实例包括甲氧基 (-O-CH₃)、甲硫基 (-S-CH₃)、-OCN、-OCF₃、氨基丙氧基 (-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、烯丙基 (-CH₂-CH=CH₂)、-O-烯丙基 (-O-CH₂-CH=CH₂)、-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_nNH₂和-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, 其中n和m是从1至约10, 2'-甲氧基乙氧基 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃)、2'-二甲基氨基氧乙氧基 (2'-O(CH₂)₂ON(CH₃)₂)、-N-甲基乙酰胺 (2'-O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃)、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、-SOCH₃、-SO₂CH₃、-ONO₂、-NO₂、-N₃、-NH₂、咪唑、羧酸酯、硫代酸酯、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷氨基、聚烷氨基和取代的甲硅烷基。

[0139] 在前描述的2'-糖基取代基团可以包含进阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。2'-阿拉伯糖修饰的实例是2'-F(2'-F-阿拉伯糖修饰的核苷酸通常指氟代阿拉伯糖核酸(FANA))。根据一些实施方式, 糖部分可以被修饰, 例如, 2'-脱氧-戊呋喃糖部分。

[0140] 在一些优选的实施方式中, 所述修饰的核苷酸包括至少一个2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[0141] 与在前描述的那些类似的修饰也可以在除了糖部分的2'位置的位置进行, 尤其是在3'末端核苷或在2'-5'连接的核苷酸的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。

[0142] **核碱基修饰:** 本文公开的核酸化合物可以包含“未修饰的”或“自然”核碱基, 所述核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G), 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。或者, 本发明的核酸化合物可以含有一个或多个取代的或者其它修饰的核碱基。核碱基修饰的非限制性实例包括5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤和腺嘌呤和鸟嘌呤的其他烷基衍生物、2-硫脲嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、5-丙炔尿嘧啶、5-丙炔胞嘧啶和嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫脲嘧啶、8-卤代腺嘌呤、8-卤代鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-巯基腺嘌呤、8-巯基鸟嘌呤、8-硫代烷基腺嘌呤、8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(如5-溴)尿嘧啶、5-卤代(如5-溴)胞嘧啶、5-三氟甲基尿嘧啶、5-三氟甲基鸟嘌呤和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-氟-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤。修饰的核碱基部分也可以包括其中嘌呤和嘧啶碱基被其他杂环取代的那些, 例如8-氮鸟嘌呤、8-氮腺嘌呤、7-脱氮-鸟嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。其他实例包括具有非嘌呤和非嘧啶碱基的核碱基, 例如2-氨基吡啶、2-吡啶酮和三嗪。

[0143] **核苷酸类似物:** 根据本发明的一些实施方式, 所述核酸化合物可以包含一种或多种核苷酸类似物。如本文使用的术语“核苷酸类似物”或者被称为“核苷酸模拟物”指其中呋喃糖环或呋喃糖环和核苷酸间连接被替代的基团取代的核苷酸。核碱基部分(修饰的或未修饰的)被保留。

[0144] 核苷酸类似物的非限制性实例包括肽核酸(PNA)(其中核苷酸的糖骨架被含酰胺的骨架(特别是氨基乙基甘氨酸骨架)取代)、吗啉代核酸(其中呋喃糖环被吗啉环取代)、环己烯基核酸(CeNA)(其中呋喃糖环被环己烯环取代)、包含双环糖部分的核酸(BNA)(例如

“锁核酸”(LNA),其中核糖糖环的2'-羟基基团连接到所述糖环的4'碳原子从而形成2'-C,4'-C-甲醛连接以形成双环糖部分、2'-O,4'-乙烯-桥连的核酸(ENA)等等)、苏糖核酸(其中羟基戊呋喃糖部分被苏糖糖部分取代)、阿拉伯核酸(ANA)(其中核糖糖部分被阿拉伯糖糖部分取代)、解锁核酸(UNA)(其中核糖环被无环类似物取代,缺乏C2'-C3'键)、镜像核苷酸(其中典型的D-核糖环被L-核糖环取代,因而形成为自然核苷酸的镜像的核苷酸)和包含2'-5'连接的核苷酸,其中典型的3'到5'核苷酸间连接被2'到5'连接(优选2'-5'磷酸基的核苷酸间连接)取代。要强调的是所描述的核苷酸类似物可以进一步修饰为上述的“修饰的核苷酸”。

[0145] 根据本发明的一些实施方式所述核酸化合物可以进一步包含至少一种非常规部分。如本文使用的术语“非常规部分”指“无碱基核苷酸”或“无碱基核苷酸类似物”。这种无碱基核苷酸包括缺乏碱基或在1'位碱基处具有其他化学基团的糖部分。所述无碱基核苷酸可以包含无碱基核糖部分(如前所述的未修饰的或修饰的)或无碱基脱氧核糖部分(未修饰的或修饰的)。另外,所述无碱基核苷酸可以是反转的无碱基核苷酸,例如,反转的无碱基氨基磷酸酯通过引起5'-5'磷酸连接的5'酰胺(而不是3'酰胺)连接。术语“无碱基核苷酸类似物”包括如上定义的任意核苷酸类似物,其中糖部分缺乏碱基或在1'位碱基处具有其他化学基团。

[0146] 末端修饰:修饰可以在末端磷酸基团上进行。可以使用不同的稳定化化学的非限制性实例,例如以稳定核酸序列的3'端,包括[3-3']-反转脱氧核糖、脱氧核糖核苷酸;[5'-3']-3'-脱氧核糖核苷酸;[5'-3']-核糖核苷酸;[5'-3']-3'-O-甲基核糖核苷酸;3'-甘油;[3'-5']-3'-脱氧核糖核苷酸;[3'-3']-脱氧核糖核苷酸;[5'-2']-脱氧核糖核苷酸和[5-3']-双脱氧核糖核苷酸。除了表明的修饰的和未修饰的骨架结构外,这些结构可以与如上所述的不同的核苷酸间连接修饰、糖修饰和/或核碱基修饰结合。

[0147] 根据本文公开的一些实施方式的所述核酸化合物可以包含平末端(即,末端不包括任何悬垂的核苷酸)。或者,本发明的核酸化合物可以包含至少一个悬垂,所述悬垂可以选自自由核苷酸悬垂(即3'-末端核苷酸悬垂)和非核苷酸悬垂组成的组。

[0148] 在具体的实施方式中,本文提供靶向p53的化学修饰的dsNA化合物、包含其的组合物和试剂盒以及将其用于治疗涉及凋亡(程序性细胞死亡)的状况或病理学的方法。在本发明的具体的实施方式中,涉及将这样的化合物用于预防来自死亡的扩展标准供体(ECD)的肾的接受者中移植物功能恢复延迟(DGF)的用途,所述肾包括从供体移除后并且在移植到接受者中之前通过冷藏已经被完整保存的肾。

[0149] 在一些实施方式中靶定和下调p53基因的核酸化合物具有寡核苷酸序列(SEQ ID NO: 8-37)。在一些实施方式中使用这样的化合物的药学上可接受的盐。在具有双链结构的核酸化合物的一些实施方式中,一条链的寡核苷酸序列选自SEQ ID NO:8-20、34和36中的一种,并且另一条链的寡核苷酸序列选自SEQ ID NO:21-33、35和37中的一种。例如,SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37。

[0150] 在一些实施方式中,p53的抑制剂是核酸分子,或这种分子的药学上可接受的盐,其具有双链结构,其中(a)所述核酸分子是包括一条正义链和一条互补反义链的二联体;

(b) 所述核酸分子的每条链在长度上是19个核苷酸；(c) 所述反义链的19个核苷酸的序列与编码哺乳动物p53的mRNA的连续序列 (例如, SEQ ID NO:1-7) 或其部分互补；和(d) 所述正义链和反义链选自下述表1中所示的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:8-37)。

[0151] 表1. 针对靶定p53的核酸化合物所选择的正义链和反义链寡核苷酸序列

SEQ ID NO	正义链 (5'>3')	SEQ ID NO	反义链 (5'>3')
8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAAGGUCUG 3'
9	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
11	5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
12	5' GGGAUGUUUGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCCAAACAUC 3'
13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3'
14	5' GAGGGAUGUUUGGAGAUA 3'	27	5' UAUCUCCCAAACAUC 3'
15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
16	5' GACUCAGACUGACAUUCUU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAA AUGC 3'
18	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG 3'
34	5' CCGAGUGGAAGGAAAUUUG 3'	35	5' CAAAUUCCUCCACUCGG 3'
36	5' GAGAAUAUUUCACCCUUCA 3'	37	5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3'

[0154] 表1中给出的正义链和反义链上的所有位置均是5' > 3'。

[0155] 在其他实施方式中, p53的抑制剂是核酸化合物 (例如, dsNA分子), 或这种化合物的药学上可接受的盐, 其中 (a) 所述核酸分子是包括一条正义链和一条互补反义链的二联体；(b) 所述核酸分子的每条链在长度上是19个核苷酸；(c) 所述反义链的19个核苷酸的序列与编码哺乳动物p53的mRNA的连续序列 (例如, SEQ ID NO:1-7) 或其部分互补；和(d) 所述正义链和反义链含有下述表2中所示的序列对。

[0156] 表2. 用于产生靶定p53的双链核酸化合物所选择的正义链和反义链对

[0157]

对名称	SEQ ID NO	正义链 (5'>3')	SEQ ID NO	反义链(5'>3')
p53_1	36	5' GAGAAUAAUUCACCCUUC A 3'	37	5' UGAAGGGUGAAAUAUUCUC 3'
p53_13	8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
p53_34	9	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	9	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_35	10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_36	11	5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
p53_37	12	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_38	13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3'
p53_39	14	5' GAGGGAUGUUUGGGAGAU 3'	27	5' UAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_40	15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
p53_41	16	5' GACUCAGACUGACAUUCU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_42	17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAA AUGC 3'
p53_43	18	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	18	5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_44	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'
	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCCC 3'

[0158]

对名称	SEQ ID NO	正义链 (5'>3')	SEQ ID NO	反义链(5'>3')
p53_45	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'

[0159] 表2中给出的正义链和反义链上的所有位置均是5' > 3'。

[0160] 在优选的实施方式中所述双链核酸分子的所述正义链和所述反义链选自由一条正义链 SEQ ID NO:36和一条反义链SEQ ID NO:37、一条正义链SEQ ID NO:16和一条反义链SEQ ID NO:29、一条正义链SEQ ID NO:19和一条反义链SEQ ID NO:32以及一条正义链SEQ ID NO:19和一条反义链SEQ ID NO:28组成的组。

[0161] QP-1002

[0162] QPI-1002 (也被称为“I5NP”, CAS号1231737-88-4) 具有分子量12319.75道尔顿(质子化形式), QPI-1002钠盐:13111.10道尔顿(钠盐), 它是被设计的通过RNA干扰(RNAi) 途径的活化暂时性抑制促凋亡基因p53表达的核酸酶抗性的、化学修饰的、合成的、双链(19碱基对) RNA寡核苷酸。QPI-1002的钠盐具有分子式: C₃₈₀H₄₄₈O₂₆₂N₁₄₀P₃₆Na₃₆。RNA二联体使用核糖2' 位置上的修饰部分保护其不被核酸酶降解。

[0163] QPI-1002的结构如下:

[0164] 5' UGAAGGGUGAAAUAUUCUC 3' (反义链) (SEQ ID NO:37)

[0165] 3' ACUCCCCACUUUAUAAGAG 5' (正义链) (SEQ ID NO:36)

[0166] 其中A、C、U和G中的每一个都是核糖核苷酸并且每一个连续的核糖核苷酸通过共价键连接到下一个核糖核苷酸；并且其中反义链和正义链上的替换核糖核苷酸是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸，并且2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸出现在所述反义链的5'末端和3'末端，未修饰的核糖核苷酸出现在所述正义链的5'末端和3'末端。这样在所述反义链中第一、第三、第五、第七、第九、第十一、第十三、第十五、第十七和第十九位核糖核苷酸的每一个都是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；并且在所述正义链中第二、第四、第六、第八、第十、第十二、第十四、第十六和第十八位核糖核苷酸的每一个都是2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸。

[0167] 作为急性肾小管(缺血再灌注)损害的结果p53蛋白被活化，所述急性肾小管损害可能发生在低温保存(特别是持续的低温保存，例如26小时或更长时间)后并且在从重大心脏手术后的心肺分流术患者的移除之后移植的供体肾中，导致凋亡/程序性细胞死亡的诱导。经由 QPI-1002的p53表达的暂时性抑制提供给近端小管上皮细胞时间以修复细胞损害并因此避免凋亡的诱导。本发明人已经显示了凋亡的暂时性阻碍诱导，降低持续缺血后的再灌注损伤的严重度、频率或持续时间。

[0168] p53的暂时性抑制剂的施用剂量必须是有效的以实现预防，所述预防包括但不限于提高的存活率或更快的恢复、或症状和如与被本领域技术人员选择的作为合适的度量的其他指标的改善或减轻或预防。本文公开的化合物可以通过任意的常规施用途径施用。应该注意的是该化合物可以以化合物或以药学上可接受的盐施用，并且可以单独施用或以与药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物结合的一种活性组分施用。所述化合物可以口服、皮下或肠胃外施用，包括静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内和鼻内施用以及脊椎内和注入技术。所述化合物的植入物也是有用的。液体形式可以制备用于注射，该术语包括皮下、经皮、静脉内、肌肉内、鞘内和其他亲代施用途径。液体组合物包括水溶液、具有和不具有有机助溶剂、水或油悬浮液、可食用油的乳剂以及类似的药学媒介物。另外，在特定情况下用于本发明的新的治疗的组合物可以形成为喷雾，用于鼻内及类似施用。被治疗的患者为温血动物并且尤其是包括人的哺乳动物。药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物以及植入物载体一般指不与本发明的活性组分反应的惰性、非毒性固体或液体填料、赋形剂或封装材料，它们包括脂质体、脂化糖胺聚糖和微球。许多这种植入物、传送系统和分子对于本领域技术人员是公知的。

[0169] 本发明已经以例证的方式描述，并且会被理解的是已经使用的专有名词意于描述文字的含义而不是意于限制。

[0170] 本文中任何文件的引用不是意于承认该文件是与本申请的任何权利要求的可专利性相关的现有技术或考虑的材料。关于任何文件的内容或日期的任何声明是基于在提交时申请人可获得的信息并且不成为关于该声明的正确性的承认。

[0171]

[0172] 没有进一步说明，认为本领域技术人员可以使用之前的描述，利用本发明至其最完全的程度。因此，接下来优选的具体实施方式被解释为仅仅是说明性的，而不是以任何方式限制要求保护的发明。

[0173] 实施例1：缺血-再灌注诱导的来自大鼠供体的肾中p53活化

[0174] 获得来自年幼(3月龄)和年老(14月龄)SD大鼠(n=4-6)的肾并使肾经受冷缺血

(CI) 5小时。来自每个动物的一个肾进行蛋白提取,而第二个肾被移植到3月龄的同系大鼠中。移植的肾在手术并且因而发生缺血-再灌注损伤(IR)后的24小时后获取,并也进行蛋白提取。针对p53表达水平,在ELISA中分析蛋白提取物。

[0175] 结果:在图1中,Y轴显示了对应于在ELISA中测定的p53蛋白水平的任意单位。图1显示了与来自年幼大鼠(3月龄)的移植的肾相比,来自更老的大鼠的移植的肾中p53蛋白水平显著增加。注意的是通过各种翻译后修饰发生的p53活化后,由于显著的蛋白稳定性其稳态水平增加。

[0176] 实施例2:p53基因的抑制剂在预防肾移植接受者中缺血再灌注损伤(IRI)和移植物功能恢复延迟(DGF)中的用途

[0177] 用于预防ESRD透析依赖性患者(其经受死亡供体肾移植)中移植物功能恢复延迟的 QPI-1002(在再灌注后30分钟时给以10mg/kg单注射IV剂量)的临床活性的安慰剂对照、随机化的、预期的、双盲、多中心、II期、剂量扩大研究以及这些患者中QPI-1002的安全性和PK。

[0178] 本研究的主要目标为1) 评估QPI-1002在预防DGF中的功效和2) 进一步评估QPI-1002 的单剂量IV输注在死亡供体肾移植后的高风险患者中的安全性。

[0179] 主要终点是DGF的发生率,而DGF在方案中被定义为移植后的前7天期间透析的必要性。次要终点包括测量透析的患者中透析严重性、移植后(5天内)即时的非透析患者中肾功能以及移植后中期观测点(即30天时)的肾功能的参数。

[0180] 实验和方法

[0181] 测试产品:QPI-1002由弗里蒙特加利福尼亚夸克制药公司提供,在磷酸盐缓冲液中配制为不含防腐剂的无菌溶液。该产品装入干净的用聚四氟乙烯涂覆的具有铝合盖顶封的丁基橡胶瓶塞密封的I型细颈瓶中。每个小瓶可以单独使用。小瓶储藏在2-8℃,避光。使用前将该溶液加热至室温。

[0182] QPI-1002通过静脉推注以10mg/kg的剂量在完成手术和从心肺分流术机器移除患者后或移植的肾的再灌注后的大约30分钟时施用。

[0183] 冷藏:从供体移除后,通过冷藏保存的肾用冷的保存溶液冲洗并置于浸入在该溶液中的无菌袋中。该无菌袋置于含有碎冰的另外的袋内。

[0184] 机器灌注:从供体移除后,通过机器灌注保存的肾连接到被构造成连续泵入灌注流体通过器官的灌注设备。常规使用的用于供体肾的机器灌注的设备的非限制性实例包括Waters RM3 (IGL/Waters Medical Systems,罗切斯特明尼苏达州) 和LifePort kidney transporter (Organ Recovery Systems,德斯普兰斯,伊利诺伊州,美国)。合适的保存溶液的非限制性实例包括UW(威斯康星大学)溶液和HTK(组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐)溶液。在机器灌注期间,监测灌注压并且如所要求的施用维拉帕米以使肾血管舒张。

[0185] 患者:在获得书面知情同意后,计划进行DDRT的332名患者随机分为1:1,在同种异体移植再灌注(建立移植肾的血流)后的手术当中,以双盲方式或者接受单IV剂量的QPI-1002 (10.0mg/kg) 或者接受等渗盐水安慰剂(0.9%NaCl)。331名患者接受研究药物(QPI-1002 或安慰剂)。由于药物分配差错,一名患者没有接受研究药物。

[0186] 下面的表格提供患者分析组的详细说明:

[0187] 表A:分析组

[0188]	ITT (意向性治疗)	所有随机的、移植的和服药的患者, 作为 <u>随机分析</u>
	ITTEE:	<u>疗效可评价 (EE) 患者</u> : 所有随机的、移植的和服药的患者, 作为 <u>随机分析</u> (除了4个在移植后的前24小时内经历移植物失功的患者以及1个没有接受研究药物的患者)-该群体用于主要疗效终点的分析
	MITT (修饰的意向性)	与 ITT 一样但是作为 <u>被治疗分析</u> -该群体用于安全性分析
[0189]	治疗):	
	mITT(EE):	与 ITTEE 一样但是作为被治疗分析-该群体用于疗效分析(次要终点)

[0190] 设计主要的合格标准以招募计划接受来自4个子群的死亡供体的肾移植的患者, 该4个子群基于方案指定的供体类型和保存方式(全部冷藏(CS)或至少部分被机器灌注(MP))而形成:

[0191] • ECD/CS: 不论持续时间, 已经通过冷藏保存冷缺血时间(CIT)的整个期间的ECD肾

[0192] • ECD/MP: 在冷缺血期间已经通过任意时间间隔的机器灌注保存的ECD肾, 其中总CIT为至少26小时

[0193] • 已经通过冷藏保存的SCD/SCD肾, 其中总CIT为至少26小时

[0194] • 在冷缺血期间已经通过任意时间间隔的机器灌注保存的SCD肾, 其中总CIT为至少26小时。

[0195] 因此, 估计的CIT持续时间不限制ECD/CS患者研究组(完全冷藏的ECD肾)的研究资格。估计的CIT持续时间限制在其他患者研究组中的资格(≥ 26 小时):

[0196] 下表提供疗效分析的分层结果:

[0197] 表B. 疗效分析的分层结果

[0198]	mITT(EE)的层%	ITT 332 名患者	mITT(EE) 327 名患者	ITTEE 327 名患者
	全部 100%	167 安慰剂 165 QPI-1002	163 安慰剂 164 QPI-1002	165 安慰剂 162 QPI-1002
	ECD/CS 54.4%	91 安慰剂 90 QPI-1002	88 安慰剂 90 QPI-1002	89 安慰剂 88 QPI-1002
	ECD/MP 11.6%	18 安慰剂 20 QPI-1002	19 安慰剂 19 QPI-1002	18 安慰剂 20 QPI-1002
	SCD/CS 11.6%	21 安慰剂 19 QPI-1002	21 安慰剂 17 QPI-1002	21 安慰剂 19 QPI-1002
	SCD/MP 22.4%	37 安慰剂 36 QPI-1002	35 安慰剂 38 QPI-1002	37 安慰剂 35 QPI-1002

[0199] 应该注意的是器官供体类型直到移植才被准确鉴定, 因此在随机时, 没有鉴定最终的器官类型。可以从表B看出, ECD/CS是最大的层(N=178(mITT(EE))), 有多于50%的患者

包括在这层。ITT和ITTEE层作为随机中使用的器官供体类型 (ECD/SCD) 出现在表B中。mITT (EE) 层按照实际的器官供体类型 (ECD/SCD) 出现在表B中。

[0200] 供体的年龄详述于下表C中：

[0201] 表C. 供体年龄

	供体	
	QPI-1002	安慰剂
年龄(年); 平均 (范围)		
-整个群体	53.9 (12-84)	53.6 (9-86)
[0202] -SCD/CS CIT >26 小时	38.1 (12-56)	38.4 (9-59)
-SCD/MP CIT >26 小时	37.1 (12-59)	38.0 (16-59)
-ECD/CS	62.9 (50-84)	62.4 (51-86)
-ECD/MP CIT >26 小时	58.5 (50-74)	58.8 (51-69)

[0203] DGF被定义为肾转移后24小时内需要透析 (不包括高钾血症和高血容量)。

[0204] 在327名疗效可评价患者 (162QPI-1002; 165安慰剂) 中, 平均年龄分别为58.9和59.1 岁; 64.8%和68.5%是男性, 23.5%和22.4%是黑种人 ($p=ns$)。基于接受者重量、身体质量指数 (BMI)、峰转移前%群体反应性抗体 (PRA)、先前输液状态或HLA错配, 没有显著的治疗差异。按照Irish nomogram (2010) 确定的转移前DGF风险在两个组中均为35-36% ($p=ns$)。在供体中, 每组中~2/3为ECD, 1/3为SCD; 平均CIT和末端血清肌酐、有高血压的%以及死亡起因在组之间没有显著不同。

[0205] 接受者和供体人口特征的详细描述提供于下表D中：

[0206] 表D. 疗效分析的分层结果

	接受者		供体	
	QPI-1002	安慰剂	QPI-1002	安慰剂
年龄 (年); 平均 (范围)	58.9 (24-85)	59.1 (23-83)	53.9 (12-84)	53.6 (9-86)
性别 (% 男性)	64.8	68.5	58.0	52.1
种族(%黑种人)	23.5	22.4	11.7	9.7
[0207] 重量*, kg; 平均 (范围)	79.4	79.2	80.8 (20.79)	82.7 (21.11)
BMI**, kg/m ² ; 平均 (SD)	27.6 (4.93)	27.6 (4.36)	-	-
先前输血, n (%)	64 (39.8)	63 (38.2)	-	-
峰% PRA***, 平均 (范围)	16.9 (0-100)	14.2 (0-99)	-	-
供体/接受者 HLA 错配, 平均 (范围)	4.4 (0-6)	4.4 (0-6)	-	-

[0208] *重量: 在筛选评价时接受者的重量;

[0209] **BMI: 身体质量指数

[0210] ***PRA: 群体反应性抗体

[0211] 表E提供非人口特征的供体DGF风险变量:

[0212] 表E. 非人口特征的供体DGF风险变量

	供体	
	QPI-1002	安慰剂
供体类型:	(N=162)	(N=165)
-ECD, n (%)	108 (66.7)	108 (65.5)
-SCD, n (%)	54 (33.3)	57 (34.5)
冷缺血时间, 小时, 平均 (范围)	22.6 (3-65)	23 (5-59)
末端 Scr*, mg/dL; 平均 (SD)	(N=159) 1.2 (0.84)	(N=165) 1.3 (0.95)
高血压史, n (%)	(N=162) 85 (52.5)	(N=165) 90 (54.5)
死亡起因	(N=112)	(N=114)
-缺氧症	30 (26.8)	29 (25.4)
-CVA/中风	80 (71.4)	84 (73.7)
-心脏病	2 (1.8)	1 (0.9)
DGF 风险几率, 平均 (SD)	(N=162) 0.35 (0.16)	(N=165) 0.36 (0.18)

[0214] 表E中:*Scr:血清肌酐浓度;*PRA:群体反应性抗体。

[0215] 结果

[0216] 疗效终点:本研究的主要终点为在所有随机和移植的患者的意向性治疗 (ITT) 群体中移植植物功能恢复延迟 (DGF) 的发生率,其中DGF被定义为在移植后的前7天内需要开始透析,其不包括如下:

[0217] (i) 由于下述一种或多种原因在前24小时期间进行透析:

[0218] • 治疗高钾血症或高血容量

[0219] • 超急性排斥或其他抗体介导的急性排斥 (活体组织检查证实)

[0220] • 与同种异体移植相关的技术性血管并发症:由血管损伤或技术性手术并发症引起的肾动脉和/或静脉血栓症。

[0221] (ii) 由于下述一种或多种原因在移植后前7天期间进行透析:

[0222] • 阻塞性尿路疾病 (放射照相证实)

[0223] • 主要疾病的爆发性复发 (潜在的ESRD病因学,活体组织检查证实),包括局灶性节段性肾小球硬化

[0224] • 血栓性微血管病的具体诊断 (血栓性血小板减少性紫癜或溶血性尿毒症综合征,活体组织检查证实)。

[0225] 除了主要终点外,也评价下面的关键探索性疗效终点:

[0226] 1. 在接受了研究药物的所有随机和移植的患者的修饰的意向性治疗 ((mITT) (EE)) 群体中DGF的发生率,其中DGF被定义为在移植后的前7天内需要急性透析,其不包括

如下:

[0227] -由于下述一种或多种原因在前24小时期间进行透析:

[0228] • 治疗高钾血症或高血容量

[0229] • 超急性排斥或其他抗体介导的急性排斥(活体组织检查证实)

[0230] • 与同种异体移植相关的技术性血管并发症:由血管损伤或技术性手术并发症引起的肾动脉和/或静脉血栓症。

[0231] -由于下述一种或多种原因在移植后前7天期间进行透析:

[0232] • 阻塞性尿路疾病(放射照相证实)

[0233] • 主要疾病的爆发性复发(潜在的ESRD病因学),包括局灶性节段性肾小球硬化

[0234] • 血栓性微血管病的具体诊断(血栓性血小板减少性紫癜或溶血性尿毒症综合征,活体组织检查证实)

[0235] 2.随时间的在肾功能的改善速度中的治疗差异

[0236] 3.在需要肾替代治疗中的治疗差异。

[0237] 如定义的,DGF分别发生在50名(30.9%)和60名(36.4%)的QPI-1002和安慰剂患者中($p=0.349$),DGF风险相对降低15.1%。在最大的患者组(ECD/CS, $n=178$)中,对于QPI-1002vs.安慰剂,DGF比率分别是27.9%和39.3%,临床有意义的相对降低30.7% ($p=0.111$)。对于QPI-1002,保持到移植后第一次透析的透析自由时间的概率显著较长提高(对数秩 $p=0.045$)并且透析的平均持续时间在该层是数字上更短的(对于QPI-1002vs.安慰剂分别为3.5vs.9.0天, $p=0.097$)。在早期移植后期间,药物的总体安全性与在DDRT接受者中所预期的一致,并且在两个治疗组中是相似的。

[0238] 表F提供了ITTEE群体(作为随机分析)中的主要疗效终点结果:

[0239] 表F.主要疗效终点(ITTEE群体)

[0240]

	QPI-1002		安慰剂		
层	N	DGF n (%)	N	DGF n (%)	相对风险降低 (%)
全体	162	50 (30.86)	165	60 (36.36)	-15.12
SCD/CS CIT>26h	19	7 (36.84)	21	7 (33.33)	10.53
SCD/MP CIT>26h	35	11 (31.43)	37	10 (27.03)	16.29
ECD/CS	88	24 (27.27)	89	35 (39.33)	-30.65
ECD/MP CIT>26h	20	8 (40.00)	18	8 (44.44)	-10

[0241] ITTEE群体和ECD/CS层中移植后前7天期间的任意时间接受的次要终点透析(UNOS定义)的结果提供于下表G中:

[0242] 表G.次要终点DGF(UNOS定义)(ITTEE群体)

[0243]

ITTEE 群体全体 (N=327)			仅 ECD/CS 层(N= 178)		
	DGF			DGF	
	N	%		N	%
QPI-1002 (n=164)	62	37.80	QPI-1002 (n=90)	32	35.56
安慰剂(n=163)	76	46.63	安慰剂(n=88)	43	48.86
相对降低 (%)	-18.9		相对降低(%)	-27.2	
风险差异(95% CI)	-8.82 (-19.49, 1.84)		风险差异(95% CI)	-13.31 (-27.69, 1.08)	
费希尔精确检 验 p 值	0.1176		费希尔精确检 验 p 值	0.0947	

[0244] 图2a和2b提供mITT (EE) 群体(图2a) 和ECD/CS层(图2b) 中保持到移植后第一次透析的透析自由时间的次要终点概率的结果,显示与整个群体相比,用QPI-1002治疗的 ECD/CS群体中更大降低的改善。

[0245] 在全部患者和ECD/CS层中透析的最初移植后进程的次要终点持续时间的结果提供于下表H中:

[0246] 表H. 透析的最初移植后进程的次要终点持续时间

[0247]

	QPI-1002		安慰剂			
	N	持续时间 (天) 平均 (SD)	N	持续时间 (天) 平均 (SD)	相对降低 (%)	P 值*
所有患者**	51	14.1 (27.75)	59	16.9 (30.91)	-17	0.620
ECD/CS*** 层	26	13.40 (34.43)	34	21.06 (39.61)	-36	0.436

[0248] *P值: (非配对t检验)

[0249] **接受了开始于移植后第一周期间的透析进程的所有患者

[0250] ***接受了开始于移植后第一周期间的透析进程的所有ECD/CS患者

[0251] 表H显示了在ECD/CS层中实现了多于30%的临床显著降低,这样在接受QPI-1002的患者中平均节省了一周的透析。

[0252] 另外的次要疗效终点是实现在移植后第一周期间的7天中的至少3天eGFR>10 mL/min/1.73m²(非基于透析的DGF定义)。结果提供于表I。

[0253] 表I. 肾功能的移植后恢复。对于前7天的≥3中的≥10%/天的血清肌酐降低的发

生率。

[0254]

	QPI-1002 (n=107)*	安慰剂 (n=92)*	相对药效 (%)	费希尔精确检验 P 值
所有患者 n (%)	63 (58.9)	52 (56.5)	4.2	0.775
	(n=58)*	(n=50)*		
ECD/CS n (%)	34 (58.6)	23 (46.0)	27.4	0.247

[0255] *限于没有接受透析进程 (以及没有接受至少48小时的任何透析) 的患者的血清肌酐浓度的分析。

[0256] 另外的非透析DGF次要疗效终点是评估的GFR (eGFR) 对移植后时间的斜率。结果提供于表J中。

[0257] 表J. 非透析DGF次要疗效终点。评估的GFR (eGFR) 对移植后时间的斜率。

[0258]

	QPI-1002		安慰剂			
	N	eGFR 斜率*, mL/min/1.73m ² / 天; 平均 (SD)	N	eGFR 斜率*, mL/min/1.73m ² / 天; 平均 (SD)	相对效果 (%)	P 值
所有患者						
- 4-变量 MDRD 等式	164	2.7 (3.63)	163	2.4 (3.45)	12.5	0.587
- Cockcroft-Gault 等式	155	2.6 (3.79)	153	2.4(4.18)	8.3	0.701
- Nankivell 等式 “B”	100	2.5 (4.01)	100	2.6 (4.68)	-4.0	0.825
ECD/CS 患者						
- 4-变量 MDRD 等式	90	2.6 (3.40)	88	1.8 (2.88)	44.4	0.065
- Cockcroft-Gault 等式	84	2.6 (3.70)	86	1.7 (3.23)	52.9	0.081
- Nankivell 等式“B”	60	2.7(4.14)	64	2.4 (4.42)	12.5	0.633

[0259] *eGFR: 在检查在完成透析的任何进程的48小时内或期间获得的血清肌酐结果后计算得到。

[0260] 另外的非透析DGF次要疗效终点是在第30天考察访问时测量的GFR, 其用非放射性标记的碘酞酸盐, 使用仅在北美网站上商业可行的方案 (Mayo Clinic, 罗切斯特明尼苏达州) 确定。第30天访问的48小时内透析依赖的患者和那些对贝类或碘造影剂具有任何过敏史的人也被排除参与该实验。结果提供于表K。

[0261] 表K. 非透析DGF次要疗效终点。在第30天考察访问时肾功能移植后恢复测量的GFR

[0262]

ITTEE 群体全体(N=327)			仅 ECD/CS 层(N= 178)		
	DGF			DGF	
	N	mGFR 平均 (SD)		N	mGFR 平均 (SD)
QPI-1002 (n=164)	62	33.8 (31.96)	QPI-1002 (n=90)	30	34.8
安慰剂 (n=163)	76	29.3 (28.13)	安慰剂 (n=88)	36	21.1
绝对 GFR 差异 (95% CI)	4.54 (-5.58, 14.67)		绝对 GFR 差异 (95% CI)	13.72 (1.02, 26.41)	
费希尔精确检验 p 值	0.376		费希尔精确检验 p 值	0.035	

[0263] 另外的非透析DGF次要疗效终点是移植后2至3天之间的尿量,如从方案规定的、第2天-第3天测定的尿量所确定的;报告的总体积归一化到每个患者24小时采集的量。分析排除了来自在透析后的任何时间直到尿采集期间(第2天-第3天)的末期接受了或者仍然在接受透析的所有患者的结果。结果提供于表L中。

[0264] 表L. 非透析DGF次要疗效终点。移植后第2天和第3天之间的尿量

[0265]	QPI-1002			安慰剂			
	N	第2天-第3天尿 量 (# 患 者>500ml/天); 平均 (SD)		N	第2天-第3天 尿量 (# 患 者 >500ml/ 天); 平均(SD)		相对效 果 (%)
	全部患者	80	71(88.8)		79	62 (78.5)	13.1
	全部 ECD/CS 患 者	40	37 (92.5)		41	28 (68.3)	35.4
							0.011

[0266] 另外的非透析DGF次要疗效终点是基于具有DGF、SGF和IGF的主体的百分比的治疗差异,如按照Humar等(Clinical Transplantation,2002)和Johnston等(NDT,2006)的标准定义的。结果提供于表M中并且数据显示QPI-1002治疗组中从DGF到缓慢移植物功能恢复(SGF)的转变。

[0267] 表M. 非透析DGF次要疗效终点。延迟的、缓慢的和即时的移植物功能恢复的发生率(EGF、SGF和IGF)。

[0268]	事件子集	QPI-1002 (N=164)	安 慰 剂 (N=163)	总 体 (N=327)	P 值, 未调整[2]	调整的比值比 [3]
	Humar 等					
	全部患者	(n=133)	(n=134)	(n=267)		
	-IGF	36 (27.1)	36 (26.9)	72 (27.0)	0.112	0.8 (0.5, 1.2)
	-SGF	35 (26.3)	22 (16.4)	57 (21.3)		
	-DGF	62 (46.6)	76 (56.7)	138 (51.7)		
	Johnston 等					
	全部患者	(n=132)	(n=136)	(n=268)		
	-IGF	31 (23.5)	33 (24.3)	64 (23.9)	0.167	0.8 (0.5, 1.3)
	-SGF	39 (29.5)	27 (19.9)	66 (24.6)		
	-DGF	62 (47.0)	76 (55.9)	138 (51.5)		

[0269] 年龄定义的局限

[0270] 主要疗效终点:在全部mITT (EE) 群体、预先指定的ECD/CS层和接受来自老于45或老于35岁的供体的肾的患者中基于主要方案定义和基于UNOS定义的DGF结果(相对风险和95%置信区间)显示于图3中。图3显示了展示在每种供体肾类型的移植物接受者中QPI-1002治疗对DGF相对风险降低的影响的森林图。相对风险(RR)被计算为在给定的患者子群中QPI-1002治疗的患者和安慰剂治疗的患者的DGF发生率之间的比。盒状图:评估的RR值用盒内的“+”标记。盒的大小与各自的样品大小成比例。线端代表各自计算的RR95%置信界限(CL)。其他定义:N-给定子群中患者的数量。RRR-相对风险降低(%),其被计算为 $RRR(\%) = 100 * (RR - 1)$ 。LCL-RRR的95%较低置信界限。UCL-RRR的95%较高置信界限。

[0271] 在接受来自老于45岁的供体(n=252;不论子群归属本研究的所有可评估患者的77%)的肾的患者中观察到最强药效,其中相对于安慰剂,QPI-1002降低了DGF的发生率约-30%。当使用该方案中DGF的主要定义或使用广泛接受的UNOS定义,这些结果都是一样的。该-30%差异是统计显著的(方案定义的DGF-p=0.048;UNOS DGF定义-p=0.016)并且是有临床意义的。另外,当供体年龄阈值低至35岁(n=281;不论子群归属本研究的所有可评估患者的86%)时,QPI-1002仍然保留其能力降低DGF比率相对-27%,临床和统计学显著差异(DGF的UNOS定义,p=0.023)。

[0272] 这些结果与新的OPTN UNOS分类一致,该OPTN UNOS分类被设计以替代之前的ECD、SCD、DCD分类。

[0273] 次要疗效终点:QPI-1002对DGF的严重性的影响通过查看移植后前30天的透析的最初进程的持续时间(以天)和透析的强度(以期(session)的数量)评估。对于这两个参数,在全部mITT (EE) 群体(n=100),和在接受ECD/CS肾的患者的子群(n=60)或在接受了来自45(n=88)或者35(n=101)岁阈值的较老供体的肾的患者中,QPI-1002产生了数量上占优势的结果。具体地,在接受ECD/CS肾的透析的QPI-1002治疗的患者中,相对于安慰剂组,透析的持续时间和强度缩短了-46%。在接受了较老肾(来自老于45或35岁的供体)的透析的患者以及全体患者群体中这些降低在-26%至-33%范围。

[0274] 通过测量尿量以及与肾小球功能相关的基于肌酐的参数(即eGFR和血清肌酐浓

度)评价非透析患者中即时移植后期间(5天)中QPI-1002对肾功能的影响。当与安慰剂组相比时,在QPI-1002治疗的ECD/CS患者中,移植后的第2天至第3天尿量大于500ml的患者数量高 35% (n=81;p=0.011)。在接受来自较老供体的肾的患者中,对于供体年龄阈值为35 (n=132) 和45 (n=118) 岁,与QPI-1002治疗相关的相应百分比增加分别是18%和20%。

[0275] 表3a、3b和3c显示了针对整个接受者群、接受了来自45岁及以上供体的肾的接受者群以及接受了来自35岁及以上供体的肾的接受者群的终点数据。“DGF的持续时间”(即,从 DGF开始日期数到DGF结束日期的总连续天数)。

[0276] 表3a:

[0277] 总群

终点	安慰剂 (N=163)	QPI-1002 (N=164)	绝对差	相对差	p 值
DGF (主要终点)	N=163	N=164			
百分数	36.2%	31.1%	-5.1	-14.09%	0.351
DGF (UNOS)	N=163	N=164			
百分数	46.6%	37.8%	-8.8	-18.88%	0.118
DGF 持续时间	N=59	N=51			
平均天数 (SD)	19.2 (36.9)	14.1 (27.8)	-5.13	-26.72%	0.417
透析强度	N=59	N=51			
平均透析期 (SD)	8.7 (15.7)	6.2 (11.8)	-2.48	-28.51%	0.356
24 小时尿量 >500 ml					
第 2 天和第 3 天之间	N=79	N=80			
百分数	78.5%	88.8%	10.3	13.12%	0.090
eGFR 斜率 Cockcroft-Gault	N=153	N=155			

	平均系数 (SD)	2.4 (4.2)	2.6 (3.8)	0.17	7.08%	0.701
	eGFR 斜率(MDRD)	N=163	N=164			
	平均系数 (SD)	2.4 (3.5)	2.7 (3.6)	0.21	8.75%	0.587
	eGFR 斜率 Nankivell	N=100	N=100			
	平均系数 (SD)	2.6 (4.7)	2.5 (4.0)	-0.14	-5.38%	0.825
[0279]	eGFR 第 30 天 Cockroft-Gault	N=127	N=116			
	平均 (SD)	42.3 (20.1)	45.7 (20.2)	3.46	8.18%	0.183
	eGFR 第 30 天 MDRD	N=151	N=146			
	平均 (SD)	41.4 (20.7)	42.2 (21.2)	0.83	2.00%	0.734
	eGFR 第 30 天 Nankivell	N=127	N=116			
	平均 (SD)	53.3 (23.2)	56.9 (22.2)	3.54	6.64%	0.226
	mGFR 第 30 天	N=76	N=62			
	平均 (SD)	42.6 (21.3)	42.5 (26.5)	-0.13	-0.31%	0.974
[0280]	表3b					
[0281]	>45岁					
	终点	安 慰 剂 (N=163)	QPI-1002 (N=164)	绝对差	相对差	p 值
	DGF (主要终点)	N=127	N=125			
	百分数	40.94	28.8	-12.14	-29.66%	0.048
[0282]	DGF (UNOS)	N=127	N=125			
	百分数	50.39	35.2	-15.19	-30.15%	0.016
	DGF 持续时间	N=52	N=36			
	平均天数 (SD)	20.7 (39.0)	14.3 (32.4)	-6.39	-30.87%	0.421

	透析强度	N=52	N=36			
	平均透析期 (SD)	9.3 (16.6)	6.2 (13.8)	-3.10	-33.3%	0.359
	24 小时尿量>500 ml					
	第 2 天和第 3 天之间	N=60	N=58			
	百分数	73.33	87.93	14.6	19.91%	0.063
	eGFR 斜率 Cockroft-Gault	N=121	N=117			
	平均系数 (SD)	2.0 (4.1)	2.4 (3.6)	0.40	20.0%	0.421
	eGFR 系数 (MDRD)	N=127	N=125			
	平均系数 (SD)	2.0 (3.3)	2.6 (3.6)	0.65	32.5%	0.136
[0283]	eGFR 斜率 Nankivell	N=83	N=81			
	平均系数 (SD)	2.4 (4.6)	2.6 (4.0)	0.19	7.92%	0.783
	eGFR 第 30 天 Cockroft-Gault	N=101	N=89			
	平均 (SD)	39.1 (20.4)	42.9 (18.7)	3.81	9.74%	0.183
	eGFR 第 30 天 MDRD	N=117	N=111			
	平均 (SD)	37.2 (19.6)	40.3 (19.9)	3.12	8.39%	0.235
	eGFR 第 30 天 Nankivell	N=101	N=89			
	平均 (SD)	50.2 (24.1)	54.9 (21.8)	4.72	8.4%	0.161
	mGFR 第 30 天	N=56	N=47	1.87	4.77%	0.663
	平均 (SD)	39.2 (20.2)	41.1 (23.2)			
[0284]	表3c:					
[0285]	>35岁					
[0286]	终点	安 慰 剂 (N=163)	QPI-1002 (N=164)	绝对差	相对差	p-值

	DGF (主要终点)	N=139	N=142			
	百分数	41.01	30.99	-10.02	-24.44%	0.084
	DGF (UNOS)	N=139	N=142			
	百分数	51.08	37.32	-13.76	-26.93%	0.023
	DGF 持续时间	N=57	N=44			
	平均天数 (SD)	19.6 (37.4)	14.0 (29.6)	-5.59	-28.52%	0.419
	透析强度	N=57	N=44			
	平均透析期 (SD)	8.9 (15.9)	6.2 (12.7)	-2.64	-29.66%	0.370
	24 小时尿量>500 ml					
	第 2 天和第 3 天之间	N=64	N=68			
	百分数	73.44	86.76	13.32	18.14%	0.079
[0287]	eGFR 斜率 Cockcroft-Gault	N=131	N=134			
	平均系数 (SD)	2.0 (4.2)	2.5 (3.8)	0.54	27.0%	0.271
	eGFR 斜率 (MDRD)	N=139	N=142			
	平均系数 (SD)	2.0 (3.3)	2.7 (3.7)	0.66	33.0%	0.115
	eGFR 斜率 Nankivell	N=90	N=87			
	平均系数 (SD)	2.3 (4.8)	2.5 (4.0)	0.20	8.70%	0.767
	eGFR 第 30 天 Cockcroft-Gault	N=109	N=102			
	平均 (SD)	40.1 (20.3)	44.0 (19.2)	3.92	9.78%	0.152
	eGFR 第 30 天 MDRD	N=129	N=126			
	平均 (SD)	38.5 (19.7)	40.4 (20.0)	1.93	5.01%	0.439
	eGFR 第 30 天 Nankivell	N=109	N=102			
	平均 (SD)	51.0 (23.7)	55.4 (21.5)	4.45	8.73%	0.156
[0288]	mGFR 第 30 天	N=63	N=54			
	平均 (SD)	41.0 (20.9)	42.3 (27.6)	1.33	3.24%	0.768

[0289] 注意表3a-3c中所有的第30天GFR值是观测值并且不是基线改变量(change from baseline)。结论:QPI-1002在经受死亡供体肾移植边缘肾的患者中的临床受益随着供体年龄增加。

[0290] 最好的主要终点结果从接受来自老于45岁供体的肾的患者中得到,不论他们的主要子群分类(其构成本研究的所有可评价患者的77%)。35岁阈值(本研究的所有可评价患者的86%,不论子群分类)产生了类似的益处,其为:

[0291] 移植后第一周透析的发生率临床有意义的并在一些子群中统计显著的降低-本研究的主要终点。

[0292] 在经历DGF的患者中透析的持续时间和强度上的临床有意义的降低。

[0293] 在非透析患者中在即时移植后期间随着时间变化的尿量和eGFR斜率的临床有意义的增加;以及,

[0294] 第30天eGFR的临床有意义的增加。

[0295] 非透析/肾功能恢复疗效结论:

[0296] 1、随着时间变化的eGFR斜率。与安慰剂治疗的患者相比,在QPI-1002治疗的患者中整个群体显示出随着时间变化的eGFR提高的速率适度的增加。然而与安慰剂治疗的患者相比,在QPI-1002治疗的患者中,ECD/CS层显示出随着时间变化的eGFR提高的速率临床显著的增加(44%MDRD)(对于通过MDRD等式计算的eGFR $p=0.065$)。

[0297] 2、第30天mGRF。对于QPI-1002治疗的患者vs.安慰剂,整个群体显示出mGRF上增加4.5mL/min/1.73m²。然而,对于QPI-1002治疗的患者vs.安慰剂,ECD/CS层显示出在mGRF 上临床和统计增加13.72mL/min/1.73m²($p=0.035$)。

[0298] 3、移植后尿量。在QPI-1002患者vs.安慰剂,整个群体显示出尿量上增加13% ($p=0.09$)。然而,在QPI-1002患者vs.安慰剂,ECD/CS层显示出在尿量上增加35%。($p=0.011$)。

[0299] 4、在QPI-1002治疗组中从DGF到SGF的转变。

[0300] 结论:在最大的(ECD/CS)组中,与接受安慰剂的患者相比,在QPI-1002治疗的患者中DGF的比率数量上较低,并且伴随有对转移后透析的需要降低以及在两个治疗组中可比的安全性。就对降低的透析需要和转移后1个月较高的GFR而言,经受完整冷藏的ECD肾的DDRT的患者可以从手术中、用QPI-1002进行再灌注后治疗受益。

[0301] 血管再灌注后用QPI-1002进行的单剂量治疗与类似于安慰剂安全性的安全性相关,并且与死亡供体肾移植的接受者中所预期的可比。

[0302] 总的来说,当与安慰剂相比时,用QPI-1002进行单剂量治疗的接受者显示出15%更低的DGF比率。该结果不是统计显著的。

[0303] 在完整冷藏的ECD肾的接受者(研究患者的最大层)中,利于QPI-1002的DGF比率上的30%治疗差异接近统计显著性($p=0.11$)。

[0304] 在以下终点中,次要终点分析显示相对于安慰剂的临床显著有益治疗差异:

- [0305] • 由经典的UNOS定义的DGF比率
- [0306] • 到第一次透析的时间
- [0307] • DGF的严重性:持续时间和强度
- [0308] • eGFR斜率
- [0309] • 移植后2-3天尿量
- [0310] • 从DGF到SGF的转变

[0311] 对于这些次要终点的许多来说,完整冷藏的ECD肾的接受者(研究的最大层)的结果更加接近(并且在一些案例中取得)统计显著性。

[0312] 就以下而言,在与用QPI-1002进行的单剂量治疗相关的ECD/CS层中观测到潜在的药物经济学益处:

[0313] • 保持不透析的显著更高的概率,如由Kaplan-Meier分析显示的(对数秩 $p < 0.05$);和

[0314] • 在移植后的前30天期间接受的更少的总透析治疗(更低的透析“强度”),接近统计显著性的差异($p < 0.10$)。

[0315] 实施例2:p53基因的抑制剂在预防来自多种年龄的供体的肾的接受者中移植物功能恢复延迟(DGF)中的用途

[0316] 使用来自不必须满足针对ECD供体的标准的多种年龄供体的肾进行类似于实施例1的研究以检测QPI-1002的效用。

[0317] 在疗效分析中,从接受来自老于45岁的供体的肾的患者(不论他们的主要子群分类,所述患者构成本研究中所有可评价患者的77%)中获得最好的主要终点结果。重要的是,35岁的阈值(本研究中所有可评价患者的86%,不论子群分类)产生了类似的益处(如下列出):

[0318] 在移植后的第一周中透析的发生率的临床有意义的并且在一些子群中统计显著性降低- 本研究的主要终点。

[0319] 在经历DGF的患者中透析的持续时间和强度上的临床有意义的减少。

[0320] 在非透析患者中即时移植后期间随着时间变化的尿量和eGFR斜率的临床有意义的增加;和,

[0321] 第30天eGFR的临床有意义的增加。

[0322] 实施例3:II期研究中的透析分析

[0323] 目标:透析具有药物经济学影响以及健康后果。因此,治疗组间从第0天至第180天的透析的数量的比较是感兴趣的。

[0324] 统计方法:以进行治疗组间比较(I5NP,安慰剂)

[0325] • 零膨胀泊松回归模型(ZIP),其是基于允许频繁的零值观测的泊松概率分布的统计模型。每个患者的透析数变量具有这种性质。

[0326] • 敏感性分析:非参数检验:Wilcoxon和Median

[0327] • 描述统计:使用计数、平均、标准偏差(SD)、中值、最小值和最大值

[0328] 分析不限于只是第一进程或以DGF事件为条件。

[0329] 分析计划:对mitt (EE) 群进行分析。

[0330] • 全部患者

[0331] • 供体年龄>35岁的患者组

[0332] • 供体年龄>45岁的患者组

[0333] 研究持续时间分析

[0334] • 0-180天和

[0335] ○ 0-7天

[0336] ○ 7(+)-30天

[0337] ○ 30+

[0338] 技术性(数据)细节:从‘Dial’文件中拖出分析数据。一般地,在‘Dial’数据组第30

天前的任何记载被认为是一期并且从第30天以及之前的记录被看做是一个进程,该进程包括起始日期和结束日期。在进程中的透析数量计算如下:进程中的透析数量=3*(该进程的最后一日期-进程的起始日期)/7。

[0339] 结果:

[0340] • 全部患者:总的来说,本研究中已经进行了936次透析。它们根据时间间隔的分布和总体总结于表4a中:

[0341] 表4a:总体透析分布和时间间隔-总群

[0342] 总体

治疗	透析计数	透析计数	透析计数	透析计数
	0<天数≤180	0<天数≤7	7<天数≤30	天>30
[0343] I5NP	375 (40%)	138 (44%)	113 (41%)	124 (36%)
安慰剂	561 (60%)	178 (56%)	162 (59%)	221 (64%)
总透析	936	316	275	345

[0344] 表4b总结了针对每个治疗组的按照患者的透析数量的平均值、STD、最小值、最大值和中值。最右边两列包括从治疗比较的不同检测获得的p值。

[0345] 表4b:治疗组间按照患者的透析平均数量比较(总群体)

[0346] 总体:透析计数0<天数≤180

治疗	N	平均值	std	最小值	中值	最大值	中值 P	wilcoxonP
[0347] I5NP	164	2.29	7.31	0	0	78	0.0857	0.112
安慰剂	163	3.44	10.47	0	0	86		

[0348] I5NP组中按照患者的透析平均数为2.29,其是安慰剂组(3.44)的~2/3。根据中值检测 p值为0.086。

[0349] 由ZIP模型获得的p值为0.014,其意味着与安慰剂组相比I5NP组中按照患者的透析数显著减少。

[0350] • 供体年龄>45肾患者子群:

[0351] • 总的来说,在供体年龄肾>45岁的子群中已经进行了796次透析。它们根据时间间隔的分布和总体总结于表4c中:

[0352] 表4c:总体透析分布和时间间隔-供体年龄>45群体

[0353] 供体年龄>45

治疗	透析计数	透析计数	透析计数	透析计数
	0<天数≤180	0<天数≤7	7<天数≤30	天>30
[0354] I5NP	269 (34%)	93 (38%)	65 (30%)	111 (33%)
安慰剂	527 (66%)	151 (62%)	155 (70%)	221 (67%)
总透析	796	244	220	332

[0355] 表4d含有对于根据治疗组间按照患者的透析平均数的描述统计。

[0356] 表4d:治疗组间按照患者的透析平均数的比较供体年龄>45群体

[0357] 供体年龄>45:透析计数 $0 < \text{天数} \leq 180$

治疗	n	平均值	std	最小值	中值	最大值	中值 P	wilcoxonP
I5NP	125	2.15	7.95	0	0	78	0.0076	0.0071
安慰剂	127	4.15	11.74	0	1	86		

[0359] I5NP组中按照患者的透析平均数为2.15,其是安慰剂组(4.14)的 $\sim 1/2$ 。差异是统计显著的,根据中值检测p值为0.0076。

[0360] 由ZIP模型获得的p值为 < 0.01 ,其意味着与安慰剂组相比I5NP组中按照患者的透析数显著减少。

[0361] • 供体年龄>35肾患者:

[0362] • 总的来说,在供体年龄肾>35岁的子群中进行了871次透析。它们根据时间间隔的分布和总体总结于表4e中:

[0363] 表4e:总体透析分布和时间间隔-供体年龄>35群体

[0364] 供体年龄>35

治疗	透析计数 $0 < \text{天数} \leq 180$	透析计数 $0 < \text{天数} \leq 7$	透析计数 $7 < \text{天数} \leq 30$	透析计数 $\text{天} > 30$
I5NP	322 (37%)	118 (41%)	88 (35%)	116 (34%)
安慰剂	549 (63%)	168 (59%)	160 (65%)	221 (66%)
总透析	871	286	248	337

[0367] 表4f含有对于根据治疗组的按照患者的透析平均数的描述统计。

[0368] 表4f:治疗组间按照患者的透析平均数的比较供体年龄>35群体

[0369] 供体年龄>35:透析计数 $0 < \text{天数} \leq 180$

治疗	n	平均值	std	最小值	中值	最大值	中值 P	wilcoxonP
I5NP	142	2.27	7.63	0	0	78	0.0149	0.0186
安慰剂	139	3.95	11.26	0	1	86		

[0371] I5NP组中按照患者的透析平均数为2.27,其是安慰剂组结果(3.95)的 $\sim 3/5$ 。差异是统计显著的,根据中值检测p-值为0.0149。

[0372] 由ZIP模型获得的p-值为 < 0.01 ,其意味着与安慰剂组相比I5NP组中按照患者的透析数显著减少。

[0373] 总结:

[0374] • 总计,QPI-1002患者组比安慰剂患者组消耗了 $\sim 2/3$ 的透析

[0375] • 根据ZIP回归模型,在整个mITTEE群中,与安慰剂组相比,在I5NP组中按照患者的透析数显著减少,并且这被敏感性非参数检测支持。

[0376] • 在根据供体年龄的子群中-p值更小并且治疗组间的差异按照患者的透析平均

数增加。

[0377] 实施例4:针对活性dsNA化合物的新序列的产生

[0378] 使用特定算法和p53基因的mRNA的已知序列(SEQ ID NO:1-7),产生了许多潜在dsNA化合物的序列。基于它们在特定算法中的分数,将寡核苷酸序列确定优先次序,作为靶定人p53基因表达的最好的预测到的序列。

[0379] 示例性的用于产生p53基因的dsNA暂时性抑制剂的正义和反义序列显示于之前的表2中,并且包括SEQ ID NO:36和37、8和21、9和22、9和31、10和23、11和24、12和25、13和26、14和27、15和28、16和29、17和30、18和31、18和22、19和32、19和28、20和33以及20和21。

[0380] 实施例5:针对活性核酸化合物的优选序列的鉴定和双链核酸化合物的产生

[0381] 基于它们的体外活性,进一步对最好得分的寡核苷酸序列确定优先顺序。为此目的,合成具有以下修饰类型的dsRNA化合物:

[0382] 在反义链和正义链具有未修饰的核糖核苷酸、并且在反义链和正义链上都具有-dTdT\$3'-末端悬垂、具有dT标明的胸苷和dT\$标明的没有末端磷酸的胸苷的dsRNA化合物。

[0383] 具有交替的2'-O-甲基(Me)糖修饰的核糖核苷酸出现在反义链的第1、3、5、7、9、11、13、15、17和19位的dsRNA化合物,借此同样的修饰,即2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸出现在正义链的第2、4、6、8、10、12、14、16和18位。

[0384] 接下来的实验用于体外活性研究。

[0385] 活性实验

[0386] 内源表达p53基因的大约 $1.5-2 \times 10^5$ 检测的人或大鼠细胞(人HCT116细胞或大鼠REF52细胞)生长在6孔板1.5ml生长培养基中大约24小时直至30-50%汇合。然后使用Lipofectamine 2000试剂以要求的每孔0.001-100nM终浓度的检测的dsNA化合物转染细胞。为了确定本研究的转染效率,5个孔独立地用Lipofectamine 2000试剂处理并定义为“阴性对照样品”,5个孔独立地用终浓度为5nM的活性dsRNA转染并定义为“对照活性样品”(阳性对照)。Cy3标记的siRNA转染的细胞用作转染效率的阳性对照。然后将细胞孵育在37+1℃、5%CO₂培养箱中48-72小时。收获dsRNA转染的细胞并用EZ-RNA试剂盒[Biological Industries (#20-410-100)]分离RNA。如下进行反转录:合成cDNA并相应地对每个样品通过实时qPCR确定人和/或大鼠p53mRNA水平并归一化到亲环素A(CYNA, PPIA)mRNA水平。基于siRNA处理的样品中mRNA的量对非转染对照样品中mRNA的量的比率确定dsRNA活性。

[0387] 作为活性研究的结果,用于下调p53基因的新的dsRNA化合物的优选序列被鉴定(结果未显示)。这些序列在之前的表1中示出(SEQ ID NO:8-37)。

[0388] 实施例6:修饰的双链核酸化合物的生成和检测

[0389] 优选的序列(SEQ ID NO:8-37)用于生成修饰的双链核酸化合物。用优选的反义链和正义链序列生成的一些修饰的双链核酸化合物显示于下面的表N和O中。下面的表P显示出用优选的反义链和正义链序列(SEQ ID NO:8-37)生成的一些优选的修饰的双链核酸化合物。

[0390] 表N.

二联体名称	正义链 (5'>3')	反义链(5'>3')
p53_34	<u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u>
p53_35	<u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>
p53_36	<u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>
p53_37	<u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>
[0391] p53_38	<u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u>
p53_39	<u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u>
p53_40	<u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>
p53_41	<u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>U</u>	<u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u>
p53_42	<u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u>
p53_43	<u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u>	<u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u>
[0392] p53_44	<u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u>	<u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>
p53_45	<u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u>	<u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>G</u>

[0393] 在上面和下面的所有表格中二联体名称用可以交替使用的前缀“p53”和“TP53”识别。

[0394] 对于表N中所有的dsRNA化合物：

[0395] A、U、G、C-代表未修饰的核糖核苷酸；

[0396] A、U、G、C-代表2-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0397] 在多种实施方式中，在表N的核酸化合物中，每条反义链和正义链的3'末端和5'末端的核糖核苷酸可以是磷酸化的或非磷酸化的。在一些实施方式中，在表N的核酸化合物中，每条反义链和正义链上，3'末端的核糖核苷酸是磷酸化的，并且5'末端的核糖核苷酸是非磷酸化的。在一些实施方式中，在表N的每个核酸化合物中，反义链和正义链均是在3'末端和5'末端非磷酸化的。

[0398] 用于生成用于下调p53基因的双链核酸化合物的特定的示例性二联体显示于本文下面的表0中。另外的二联体提供于下面的实施例部分。

[0399] 表0.P53二联体

[0400]

二联体 名称	正义 (N')y 5->3	反义(N)x 5->3
p53_13	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> <u>A</u> C <u>U</u> -C3-pi	AGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	AGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> <u>A</u> C <u>U</u> -pi	<u>A</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-pi
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAACuaca-C3-pi	<u>U</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> <u>A</u> C <u>A</u> -C3-pi	<u>U</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G-pi
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> <u>A</u> C <u>A</u> -pi	UGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> <u>A</u> C <u>A</u>	UGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> <u>U</u> AGGUC <u>U</u> G
p53_34	cap-GGAUGUUUGGAGAU <u>G</u> <u>U</u> AA-C3-pi	<u>U</u> U <u>A</u> C <u>A</u> UcUCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGAGAUguaa-C3-pi	<u>U</u> U <u>A</u> C <u>A</u> UcUCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGAGAUguaa-C3-pi	AU <u>A</u> C <u>A</u> UcUCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGAGAU <u>G</u> <u>U</u> AU-C3-pi	<u>U</u> U <u>A</u> C <u>A</u> UcUCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGAGAUguau-C3-pi	A <u>U</u> <u>A</u> C <u>A</u> UcUCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	GGAUGUUUGGAGAU <u>G</u> <u>U</u> AUzdTzdT\$	AUACAUCUCCCAAACAUCczdTzdT\$
p53_35	cap-GACUCAGACUGAC <u>A</u> uucua-C3-pi	<u>U</u> AGAAUg <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGAC <u>A</u> U <u>U</u> C <u>U</u> A-C3-pi	<u>U</u> AGAAUg <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGAC <u>A</u> U <u>U</u> C <u>U</u> A-C3-pi	<u>U</u> AGAA <u>u</u> GU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGAC <u>A</u> U <u>U</u> C <u>U</u> A-C3-pi	<u>U</u> AGAAUg <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3

[0401]

二联体 名称	正义 (N')y 5->3	反义(N)x 5->3
	GACUCAGACUGACAUUCUAzdTzdT\$	UAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$
p53_40	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi	UUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAcugaa-C3-pi	UUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	UUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi	AUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi	UUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi	UUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	GGGCCUGACUCAGACUGAAzdTzdT\$	UUCAGUCUGAGUCAGGCCzdTzdT\$
p53_41	cap-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi	AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACAUCUU-C3-pi	AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACAUUUU-C3-pi	AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACAUUUU-C3-pi	AAGAAuGUAGUCUGAGUC-C3-C3
	GACUCAGACUGACAUUCUUzdTzdT\$	AAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$
p53_43	cap-GGAUGUUUGGGAGAuguau-C3-pi	AUA <u>CA</u> UcUCC <u>CAAA</u> CAUCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGAU <u>GU</u> AU-C3-pi	AUA <u>CA</u> UcUCC <u>CAAA</u> CAUCC-C3-C3
p53_44	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi	AUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	AUCAGuCUAGUCAGGCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3
p53_45	cap-CAGACCUAUGGAAAcuaca-C3-pi	UGUAGUuUCCA <u>UA</u> AGGUCUG-C3-C3
	cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-C3-pi	UGUAGUUUCCA <u>UA</u> AGGUCUG-pi
	cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-pi	UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG

[0402] 对于表0中所有的双链核酸化合物：

[0403] A、U、G、C-代表未修饰的核糖核苷酸；

[0404] A、U、G、C-代表2-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸；

[0405] a、u、c、g-代表通过2' -5' 核苷酸间磷酸键(5' >3') 连接至相邻核苷酸的核苷酸；

[0406] cap-代表帽部分。在一些优选的实施方式中，该帽部分是由脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、反转的脱氧核糖部分、反转的脱氧脱碱基部分(idAb)、氨基-C6部分(AM-c6)、C6-氨基-pi、非核苷酸部分、镜像核苷酸、5,6,7,8-四氢-2-萘丁二酯(THNB)和结合部分组成的组。

[0407] pi-代表3' -磷酸。

[0408] z-代表帽部分。

[0409] \$-代表无末端磷酸。

[0410] dT\$-代表胸苷(无磷酸)

[0411] C3--代表1,3-丙二醇,单(磷酸二氢根)(C3) [CAS RN:13507-42-1]。

[0412] C3-C3-代表两个连续的C3分子。

[0413] 在之前表0中所述的核酸化合物的多种实施方式中,共价连接在反义链的3'末端的C3-C3非核苷酸悬垂是磷酸化的(-C3-C3-pi)。

[0414] 在之前表0中所述的核酸化合物的一些实施方式中,在每个核酸化合物中,反义链的5'末端的核糖核苷酸是磷酸化的。在之前表0中所述的核酸化合物的一些实施方式中,在每个核酸化合物中,反义链的5'末端的核糖核苷酸是非磷酸化的。

[0415] 表P

	正义 (N')y	反义 (N)x
dsRNA 化合物	5->3	5->3
TP53_13_S2275	C3-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -C3-pi	5' phos-AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUCUG-C3;C3-pi
TP53_13_S2276	C3-CAGACCUAUGGAAACU <u>ACU</u> -C3-pi	5' phos-AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUCUG-C3;C3-pi
TP53_13_S2277	C3-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	5' phos-AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUCUG-C3;C3-pi
TP53_13_S2278	C3-CAGACCUAUGGAAACuacu-C3-pi	5' phos-AGUAGUuUCC <u>AU</u> AGGUCUG-C3;C3-pi
TP53_41_S709	GACUCAGACUGACAUCUU-dTdT\$	AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$
[0416] TP53_41_S2279	C3-GACUCAGACUGACA <u>UCU</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2298	C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi	5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2299	C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi	5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_41_S2300	C3-GACUCAGACUGACA <u>UCU</u> -C3-pi	5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_44_S2301	C3-GGGCCUGACUCAGACugau-C3-pi	5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2302	C3-GGGCCUGACUCAGACugau-C3-pi	5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2303	C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S2304	C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi	5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi

[0417] 在上面和下面的所有表格中二联体名称用可以交替使用的前缀“p53”和“TP53”识别。因此,例如用前缀“p53_13”和“TP53_13”识别的化合物代表具有正义链序列5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' (SEQ ID NO:8)和反义链序列5' AGUAGUUCCAAGGUCUG 3' (SEQ ID NO:21)的双链核酸化合物。

[0418] 对于表P中所有的dsRNA化合物:

[0419] A、U、G、C-代表未修饰的核糖核苷酸;

[0420] A、U、G、C-代表2-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸;

[0421] a、u、c、g-代表通过2'-5'核苷酸间磷酸键连接至相邻核苷酸(5'>3')的核苷酸;

[0422] C3-代表1,3-丙二醇,单(磷酸二氢根),也识别为3-羟基丙基-1-磷酸帽部分[CAS RN: 13507-42-1]。

[0423] C3-C3-代表两个连续的C3分子组成的帽部分。

[0424] pi-代表3'-磷酸。

[0425] 5'-phos-代表5'-磷酸

[0426] 这些和其它化学修饰可以除其它外在美国专利和美国申请公布8,362,229、20120283309、20130035368、20130324591中(其给本申请的受让人并且通过引用并入本

文)中找到。

[0427] 在人HCT116细胞和大鼠REF52细胞中研究修饰的双链核酸化合物的活性。

[0428] 表Q总结了在人HCT116细胞系中针对一些双链核酸分子获得的体外活性结果。所有的 dsNA化合物描述于之前的表P中。

[0429] p53_13_S500化合物具有正义链SEQ ID NO:8和反义链SEQ ID NO:21以及下面的修饰类型:交替的2'-O-甲基(Me)糖修饰的核糖核苷酸出现在反义链的第1、3、5、7、9、11、13、15、17和19位,而同样的修饰,即2'-O-甲基糖修饰的核糖核苷酸出现在正义链的第2、4、6、8、10、12、14、16和18位。

[0430] 表Q中的体外活性表示为相对于对照%残余的靶mRNA。

[0431] 表Q

[0432]

样品描述 (所用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA 的%
无 (对照)		100
p53_13_S500	50nM	25
p53_13_S500	25nM	14
p53_13_S500	5nM	33
p53_13_S500	1nM	55
p53_1_S500	50nM	22
p53_1_S500	25nM	16
p53_1_S500	5nM	52
p53_1_S500	1nM	107
p53_13_S2275	50nM	19
p53_13_S2275	25nM	14
p53_13_S2275	5nM	25
p53_13_S2275	1nM	60
p53_13_S2276	50nM	19

[0433]

样品描述 (所用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA 的%
p53_13_S2276	25nM	19
p53_13_S2276	5nM	44
p53_13_S2276	1nM	112
p53_13_S2277	50nM	22
p53_13_S2277	25nM	14
p53_13_S2277	5nM	38
p53_13_S2277	1nM	112
p53_13_S2278	50nM	41
p53_13_S2278	25nM	25
p53_13_S2278	5nM	49
p53_13_S2278	1nM	99
p53_41_S709	50nM	5
p53_41_S709	25nM	8
p53_41_S709	5nM	14
p53_41_S709	1nM	30
p53_41_S2279	50nM	3
p53_41_S2279	25nM	8
p53_41_S2279	5nM	3
p53_41_S2279	1nM	5
p53_41_S2298	50nM	5
p53_41_S2298	25nM	8
p53_41_S2298	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	
p53_41_S2299	50nM	3
p53_41_S2299	25nM	3
p53_41_S2299	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	5
p53_41_S2300	50nM	3
p53_41_S2300	25nM	3
p53_41_S2300	5nM	2

[0434]

样品描述 (所用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA 的%
p53_41_S2300	1nM	3
p53_44_S2301	50nM	5
p53_44_S2301	25nM	5
p53_44_S2301	5nM	3
p53_44_S2301	1nM	14
p53_44_S2302	50nM	3
p53_44_S2302	25nM	3
p53_44_S2302	5nM	5
p53_44_S2302	1nM	8
p53_44_S2303	50nM	3
p53_44_S2303	25nM	5
p53_44_S2303	5nM	3
p53_44_S2303	1nM	3
p53_44_S2304	50nM	5
p53_44_S2304	25nM	5
p53_44_S2304	5nM	11
p53_44_S2304	1nM	19

[0435] 表R总结了在大鼠REF52细胞系中针对一些双链核酸分子获得的体外活性结果。

[0436] 表R中的体外活性表示为相对于对照%残余的靶mRNA。

[0437] 表R

[0438]

样品描述 (所用的 dsRNA 化合物)	dsRNA 化合物的浓度	对照的 p53 残余 mRNA 的%
REF52 对照	无	100
p53_13_S500	50nM	26
	25nM	30
	5nM	63
	1nM	68
p53_41_S709	50nM	40
	25nM	87

[0439]

	5nM	96
	1nM	211
p53_41_S2279	50nM	38
	25nM	20
	5nM	21
	1nM	60
p53_41_S2298	50nM	137
	25nM	81
	5nM	71
	1nM	113
p53_41_S2299	50nM	116
	25nM	122
	5nM	107
	1nM	153
p53_41_S2300	50nM	102
	25nM	81
	5nM	112
	1nM	149
p53_44_S2301	50nM	12
	25nM	14
	5nM	25
	1nM	55
p53_44_S2302	50nM	14
	25nM	9
	5nM	18
	1nM	59
p53_44_S2303	50nM	20
	25nM	12
	5nM	12
	1nM	38
p53_44_S2304	50nM	22
	25nM	33
	5nM	

[0440]

	1nM	
--	-----	--

[0441] 实施例7:使用psiCHECKTM-2-系统评价双链RNA分子的敲除活性

[0442] 制备用于评价潜在活性的3个psiCHECKTM-2基的(Promega)构件。该psiCHECK构件含有单拷贝的匹配的互补引导(AS-CM)。在10cm盘中接种 $1.3-1.5 \times 10^6$ 个人HeLa细胞。然后将细胞在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培养24小时。接种后每天用8ml新鲜的生长培养基替换生长培养基并且每盘用LipofectamineTM 2000试剂根据使用手册用上述的一种质粒转染并在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 和5%CO₂下孵育5小时。孵育后,将细胞以每孔80μl生长培养基中 5×10^3 个细胞的终浓度继代于96孔板。16小时后,使用LipofectamineTM 2000试剂以100μl终体积中0.01nM至100nM范围的终浓度用转染RNA化合物转染细胞。在如下述评估Renilla和FireFly萤光素酶活性后,然后将细胞在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下孵育48小时。

[0443] 在用双链RNA化合物转染后48小时,使用Dual-Luciferase® Assay kit (Promega, Cat#E1960) 根据使用步骤测量每个siRNA转染的样品中Renilla和FireFly萤光素酶活性。对于每个样品, Renilla萤光素酶活性值除以FireFly萤光素酶活性值(归一化)。Renilla萤光素酶活性最终表示为检测样品中归一化的活性值相对于在仅用相应的psiCHECKTM-2质粒而没有用双链RNA转染的细胞中获得的归一化的值的百分数。

[0444] psiCHECKTM-2—系统中的活性研究结果(结果未显示)用于选择生成用于下调p-53基因的高活性双链核酸化合物的最高活性序列。

[0445] 虽然以上实施例已经说明了进行本发明的实施方式的详细方式,但是在实践中本领域技术人员会领会进行本发明的实施方式的其它方式,这些其它方式没有在本文中明确显示。应该理解的是本公开内容会被认为是本发明的原理的一种范例而不意于将本发明限制到所列举的实施方式。

[0446] 使用至多常规实验,本领域技术人员会领会或能确定本文描述的本发明的具体实施方式的等同物。这种等同物要包含在下面的权利要求中。

序列表

<110> 夸克制药公司

<120> 用于预防器官中缺血再灌注损伤的方法和组合物

<130> FSP1V162152ZX-DIV

<150> 62/004239

<151> 05-29-2014

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2586

<212> RNA

<213> 人

<400> 1

```

gauuggggguu uuccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucua 60
aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu 120
cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc agccagacug 180
ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcgucgag cccccucuga 240
gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cugucccccu 300
ugccguccca agcaauggau gauuugaugc ugucuccgga cgauauugaa caaugguuca 360
cugaagacc ccaggucagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccguggccc 420
cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuccugg cccugucau 480
cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuucuugc 540
auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacucucc ugcccuaac aagauguuuu 600
gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uuccacacc cggcccggca 660
cccgcguccg cgccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc 720
gcugccccca ccaugagcgc ugcucagaua gcgauggucu ggccccuccu cagcaucuua 780
uccgagugga aggaaaauug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuucgacaua 840
gugugguggu gcccuaugag ccgccugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca 900
acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cucaccauca 960
ucacacugga agacuccagu gguaaucuac ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu 1020
gugccugucc ugaggagagac cggcgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc 1080
cucaccacga gcugccccca gggagcacua agcgagcacu gccaacaac accagcuccu 1140
cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauauuu caccuucag auccgugggc 1200
gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg 1260
cugggaagga gccagggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaagucc aaaaaggguc 1320
agucuaccuc ccgccauaaa aaacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac 1380
auucuccacu ucuuguuccc cacugacagc cuccacccc caucucucc ucccugcca 1440
uuuuggguuu ugggucuuug aaccuuugcu ugcaauaggu gugcgucaga agcaccagc 1500

```


acuuccauuu gcuuuguccc ggggcuccac ugaacaaguu ggccugcacu gguguuuugu 1560
 uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagcuuaga uuuuaagguu uuucuguga 1620
 gggauuguug ggagauguua gaaauguucu ugcaguuaag gguuaguua caaucagcca 1680
 cauucaggu aggggcccac uucaccguac uaaccaggga agcugucccu cacuguugaa 1740
 uuucucuaa cuucaaggcc cauauugug aaaugcuggc auuugcaccu accucacaga 1800
 gugcauugug aggguuuaug aaauaauua caucuggccu ugaaaccacc uuuuauuaca 1860
 uggggucuaag aacuugaccc ccuugagggu gcuuguuccc ucucccuguu ggucgguggg 1920
 uugguaguuu cuacaguugg gcagcugguu agguagaggg aguugucaag ucucugcugg 1980
 cccagccaaa ccugucuga caaccucuug gugaaccuua guaccuaaaa ggaaauuca 2040
 ccccauccca caccuggag gauuucucu cuuguauaug augaucugga uccaccaaga 2100
 cuuguuuuau gcucagggu aaauucuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu ucuuuuucuu 2160
 ugagacuggg ucucgcuuug uugcccaggc uggaguggag uggcgugauc uggcuuacu 2220
 gcagccuuug ccucuccggc ucgagcaguc cugccucagc cuccggagua gcugggacca 2280
 cagguucaug ccaccauggc cagccaacuu uugcauguuu uguagagau gggucucaca 2340
 guguuuccca ggcuggucuc aaacuccugg gcucaggcga uccaccuguc ucagccuccc 2400
 agagugcugg gauuacaauu gugagccacc acguccagcu ggaaggguca acauuuuua 2460
 cauucugcaa gcacaucugc auuuucaccc caccuuccc cuccuucucc cuuuuuauau 2520
 cccauuuuuu uaucgaucuc uuauuuuaca auaaaacuuu gcugccaccu gugugucuga 2580
 ggggug 2586

<210> 2

<211> 2583

<212> RNA

<213> 人

<400> 2

gauugggguu uuccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucua 60
 aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu 120
 cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc cagacugccu 180
 uccgggucac ugccauggag gagccgcagu cagauccuag cgucgagccc ccucugaguc 240
 aggaaacauu uucagaccua uggaacuac uuccugaaaa caacguucug uccccuugc 300
 cgucccaagc aauggaugau uugaugcugu ccccggacga uauugaacaa ugguucacug 360
 aagacccagg uccagaugaa gcucccagaa ugccagaggc ugcucuccccc guggccccug 420
 caccagcagc uccuacaccg gcggccccug caccagcccc cuccuggccc cugucaucuu 480
 cugucccuuc ccagaaaacc uaccagggca gcuacgguuu ccgucugggc ucuugcauu 540
 cugggacagc caagucugug acuuugcacgu acucccugc ccucaacaag auguuuugcc 600
 aacuggccaa gaccugcccu gugcagcugu ggguugauuc cacacccccg cccggcacc 660
 gcguccgcgc cauggccauc uacaagcagu cacagcau gacggagggu gugaggcgcu 720
 gccccacca ugagcgcugc ucagauagcg auggucuggc ccuccucag caucuaucc 780
 gaguggaagg aaauuugcgu guggaguauu uggaugacag aaacacuuu cgacauagug 840
 ugguggugcc cuaugagccg ccugagguug gcucugacug uaccaccauc cacuacaacu 900

acauguguaa	caguuccugc	augggcggca	ugaaccggag	gcccuccuc	accucauca	960
cacuggaaga	cuccaguggu	aaucuacugg	gacggaacag	cuuugaggug	cguguuugug	1020
ccuguccugg	gagagaccgg	cgcacagagg	aagagaauuc	ccgcaagaaa	ggggagccuc	1080
accacgagcu	gccccaggg	agcacuaagc	gagcacugcc	caacaacacc	agcuccucuc	1140
cccagccaaa	gaagaaacca	cuggauggag	aaauuuucac	ccuucagauc	cgugggcgug	1200
agcgcuucga	gauguuccga	gagcugaau	aggccuugga	acucaaggau	gcccaggcug	1260
ggaaggagcc	aggggggagc	agggcucacu	ccagccaccu	gaaguccaaa	aaggguccag	1320
cuaccucccg	ccauaaaaaa	cucauguuca	agacagaagg	gccugacuca	gacugacauu	1380
cuccacuucu	uguuuccccac	ugacagccuc	ccacccccau	cucucccucc	ccugccauuu	1440
uggguuuugg	gucuuugaac	ccuugcuugc	aaauaggugug	cgucagaagc	acccaggacu	1500
uccauuuugcu	uugucccggg	gcuccacuga	acaaguuggc	cugcacuggu	guuuuguugu	1560
ggggaggagg	augggggagua	ggacauacca	gcuuagauuu	uaagguuuuu	acugugaggg	1620
auguuuggga	gauguaagaa	auguucuugc	aguuaagguu	uaguuuacaa	ucagccacau	1680
ucuagguagg	ggccccacuuc	accguacuua	ccagggaagc	ugucccucac	uguugaauuu	1740
ucucuaacuu	caaggccccau	aucugugaaa	ugcuggcauu	ugcaccuacc	ucacagagug	1800
cauugugagg	guuaauggaa	uaauguacau	cuggccuuga	aaccaccuuu	uauuacaugg	1860
ggucuaagaac	uugacccccu	ugagggugcu	uguucccucu	cccuguuggu	cgguggguug	1920
guaguuuua	caguugggca	gcugguuagg	uagagggagu	ugucaagucu	cugcuggccc	1980
agccaaaccc	ugucugacaa	ccucuuggug	aaccuuagua	ccuaaaagga	aaucucaccc	2040
caucccacac	ccuggaggau	uucaucucuu	guauaugaug	aucuggaucc	accaagacuu	2100
guuuuauugu	cagggucaau	uuuuuuuuuc	uuuuuuuuuu	uuuuuuuucu	uuuucuuuga	2160
gacuggguucu	cgcuuuguug	cccaggcugg	aguggagugg	cgugaucuu	gcuuacugca	2220
gccuuugccu	ccccggcucg	agcaguccug	ccucagccuc	cggaguagcu	gggaccacag	2280
guucaugcca	ccauggccag	ccaacuuuug	cauguuuugu	agagaugggg	ucucacagug	2340
uugcccaggc	uggucucaaa	cuccugggcu	caggcgaucc	accugucuca	gccucccaga	2400
gugcugggau	uacaauugug	agccaccacg	uccagcugga	agggucaaca	ucuuuuacau	2460
ucugcaagca	caucugcauu	uucaccccac	ccuuccccuc	cuucucccuu	uuuauauccc	2520
auuuuuauau	cgaucucuua	uuuuacaaua	aaacuugcu	gccaccugug	ugucugaggg	2580
gug	2583					
<210>	3					
<211>	2719					
<212>	RNA					
<213>	人					
<400>	3					
gauuggggguu	uuccccuccc	augugcucaa	gacuggcgcu	aaaaguuuug	agcuucucua	60
aagucuagag	ccaccgucca	gggagcaggu	agcugcuggg	cuccggggac	acuuugcguu	120
cgggcuggga	gcgugcuuuc	cacgacggug	acacgcuucc	cuggauuggc	agccagacug	180
ccuuccgggu	cacugccaug	gaggagccgc	agucagaucc	uagcgucgag	ccccucuga	240
gucaggaaac	auuuucagac	cuauggaaac	uacuuccuga	aaacaacguu	cugucccccu	300

ugccguccca agcaauggau gauuugaugc uguccecgga cgauauugaa caaugguuca 360
 cugaagacccc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccguggccc 420
 cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuccugg cccugucau 480
 cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuucucg 540
 auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacucucc ugcccuaac aagauguuuu 600
 gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uuccacaccc ccgcccggca 660
 cccgcguccg cgccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc 720
 gcugccccc acaugagcgc ugcucagaua gcgauggucu ggcccuccu cagcaucuua 780
 uccgagugga aggaaaauug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuucgacaua 840
 gugugguggu gcccuaugag ccgccugagg ugggcucuga cuguaccacc auccacuaca 900
 acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cucaccauca 960
 ucacacugga agacuccagu gguaaucuac ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu 1020
 gugccugucc ugggagagac cggcgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc 1080
 cucaccacga gcugccccc gggagcacua agcgagcacu gcccacaac accaguccu 1140
 cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauuuu caccuucag gaccagacca 1200
 gcuuucaaaa agaaaaauug uaaagagagc augaaaugg uucuaugacu uugccugaua 1260
 cagaugcuac uugacuucg augguguuac uuccugauaa acucgucgua aguugaaaau 1320
 auuauccgug ggcgugagcg cuucgagaug uuccgagagc ugaauaggc cuuggaacuc 1380
 aaggauccc aggcugggaa ggagccagg gggagcagg cucacuccag ccaccugaag 1440
 uccaaaaagg gucagucuac cucccgccau aaaaaacua uguucaagac agaagggccu 1500
 gacucagacu gacauucucc acuuucuuu cccacugac agccuccac ccccaucucu 1560
 cccuccccug ccauuuggg uuugggucu uugaaccuu gcuugcaua ggugugcugc 1620
 agaagcacc aggacuucca uuugcuuuu cccggggcuc cacugaacaa guuggccugc 1680
 acugguguuu uguuguggg aggaggauug ggaguaggac auaccagcuu agauuuuaag 1740
 guuuuuacug ugagggaugu uuugggagu uaagaaugu ucuugcagu aaggguuagu 1800
 uuacaaucag ccacauucua gguaggggcc cacuucaccg uacuaaccag ggaagcugc 1860
 ccucacuguu gaauuuucuc uaacuucag gcccauauu gugaaaugc ggcauuugca 1920
 ccuaccucac agagugcauu gugaggguua augaaauau guacaucug ccuugaaacc 1980
 accuuuuuu acaugggguc uagaacuuga ccccuugag ggugcuuguu cccuccccu 2040
 guuggucggu ggguugguag uuucucagu ugggcagcug guuagguaga gggaguuguc 2100
 aagucucugc ugcccagcc aaaccucugc ugacaaccuc uuggugaacc uuaguaccua 2160
 aaaggaaauc ucaccccauc ccacaccug gaggauuua ucucuuguau augaugaucu 2220
 ggauccacca agacuuguuu uaugcucagg gucaauuuc uuuuuuuuu uuuuuuuuu 2280
 uuuucuuuuu cuuugagacu gggucucgcu uuguugccc ggcuggagug gaguggcgug 2340
 aucuuggcuu acugcagccu uuuccucucc ggcucagca guccugccuc agccuccgga 2400
 guagcuggga ccacagguuc augccaccau ggccagccaa cuuuugcaug uuuguuagag 2460
 auggggucuc acaguguugc ccaggcuggu cucaaaccuc ugggcucagg cgauccaccu 2520
 gucucagccu cccagagugc ugggaauaca auugugagcc accacgucca gcuggaagg 2580
 ucaacaucuu uuacaauucg caagcacauc ugcauuuua cccacccuu cccuccuuc 2640

uccuuuuua uaucccauuu uuauaucgau cucuuuuuuu acauuaaaac uuugcugcca 2700
 ccuguguguc ugaggggug 2719
 <210> 4
 <211> 2646
 <212> RNA
 <213> 人
 <400> 4
 gauuggggguu uuccccuucc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucua 60
 aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu 120
 cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc agccagacug 180
 ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagauc uagcgucgag ccccucuga 240
 gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cugucccccu 300
 ugccgucca agcaauggau gauuugauc ugucuccgga cgauauugaa caaugguuca 360
 cugaagacc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcucc cccguggccc 420
 cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuccugg cccugucau 480
 cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuucuugc 540
 auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacuccc ugcccuaac aagauguuu 600
 gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uuccacacc cggcccggca 660
 cccgcguccg cgccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc 720
 gcugccccca ccaugagcgc ugcucagaua gcgauggucu ggccccuccu cagcaucuua 780
 uccgagugga aggaaauuug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuucgacaua 840
 gugugguggu gcccuaugag ccgccugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca 900
 acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggccauc cucaccauca 960
 ucacacugga agacuccagu gguaaucuac ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu 1020
 gugccugucc ugggagagac cggcgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc 1080
 cucaccacga gcugccccc gggagcacua agcgagcacu gcccaacaac accagcuccu 1140
 cuccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauuuu caccuucag augcuacuug 1200
 acuuacgaug guguuacuuc cugauaaacu cgucguaagu ugaaaauuu auccgugggc 1260
 gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg 1320
 cugggaagga gccagggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaagucc aaaaaggguc 1380
 agucuaccuc ccgccauaaa aaacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac 1440
 auuccuacu ucuuguuccc cacugacagc cuccacccc caucucucc ucccugcca 1500
 uuugggguuu ugggucuuug aacccuugcu ugcaauaggu gugcgucaga agcaccagg 1560
 acuucauuu gcuuuguccc ggggcuccac ugaacaaguu ggccugcacu gguguuuugu 1620
 uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagcuuaga uuuuaagguu uuucuguga 1680
 gggauuuug ggagauguua gaaauguucu ugcaguuaag gguuaguua caucagcca 1740
 cauucuaggu aggggcccac uucaccguac uaaccaggga agcugucccu cacuguugaa 1800
 uuucucuaa cuucaaggcc cauauucug aaaugcuggc auuugcaccu accucacaga 1860
 gugcauugug aggguuuauug aaauaaugua caucuggccu ugaaaccacc uuuaauuaca 1920

uggggucuaag aacuugaccc ccuugagggu gcuuguuccc ucucccuguu ggucgguggg 1980
 uugguaguuu cuacaguugg gcagcugguu agguagaggg aguugucaag ucucugcugg 2040
 cccagccaaa cccugucuga caaccucuug gugaaccuua guaccuaaaa ggaaaucuca 2100
 ccccauccca caccugggag gauuucacuc cuuguauaug augaucugga uccaccaaga 2160
 cuuguuuuau gcucaggguc aaauucuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 2220
 ugagacuggg ucucgcuuug uugcccaggc uggaguggag uggcgugauc uggcuuacu 2280
 gcagccuuug ccuccccggc ucgagcaguc cugccucagc cuccggagua gcugggacca 2340
 cagguucaug ccaccauggc cagccaacuu uugcauguuu uguagagaug gggucucaca 2400
 guguugccca ggcuguguc aaacuccugg gcucaggcga uccaccuguc ucagccuccc 2460
 agagugcugg gauuacaauu gugagccacc acguccagcu ggaaggguca acauuuuua 2520
 cauucugcaa gcacaucugc auuuucaccc caccuuuccc cuccuucucc cuuuuuauau 2580
 cccauuuuuu uaucgaucuc uuauuuuaca auaaaacuuu gcugccaccu gugugucuga 2640
 ggggug 2646
 <210> 5
 <211> 2271
 <212> RNA
 <213> 人
 <400> 5
 ugaggccagg agauggaggc ugcagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag 60
 ugacagagca agaccuauuc ucaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag 120
 acgccaacuc ucucuagcuc gcuagugggu ugcaggaggu gcuuacgau guuuguuucu 180
 uugcugccgu cuuccaguug cuuuauucgu ucacuugugc ccugacuuc aacucugucu 240
 ccuuccucuu ccuacaguac uccccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga 300
 ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcacccgc guccgcgcca 360
 uggccaucua caagcaguca cagcacauga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug 420
 agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa 480
 auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugcccu 540
 augagccgcc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaaca 600
 guuccugcau gggcggaug aaccggaggc ccauccucac cauauccca cuggaagacu 660
 ccagugguaa ucuacuggga cggaacagcu uugaggugcg uguuugugcc uguccuggga 720
 gagaccggcg cacagaggaa gagaauccucc gcaagaaagg ggagccucac cacgagcugc 780
 ccccaggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucuccc cagccaaaga 840
 agaaaccacu ggauggagaa uauuuacccc uucagaucg ugggcgugag cgcuuugaga 900
 uguuccgaga gcugaaugag gccuuggaac ucaaggaucc ccaggcuggg aaggagccag 960
 gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accuccgcc 1020
 auaaaaaacu cauguucaag acagaagggc cugacucaga cugacauucu ccacuucuu 1080
 uucccacug acagccuccc acccccacuc cuccucuccc ugccaauuug gguuuugggu 1140
 cuuugaaccc uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuc cauugcuuu 1200
 gucccggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuguugugg ggaggaggau 1260

ggggaguagg acauaccagc uuagauuuua agguuuuuac ugugagggau guuugggaga 1320
 uguaagaaau guucuugcag uuaaggguaa guuuacaauc agccacauuc uagguagggg 1380
 cccacuucac cguacuaacc aggggaagcug ucccucacug uugaauuuuc ucuaacuua 1440
 agggccauau cugugaaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uuugaggggu 1500
 uaaugaaaau auguacaucu ggccuugaaa ccaccuuuaa uuacaugggg ucuagaacuu 1560
 gacccccuug agggugcuug uucccucucc cuguuggucg guggguuggu aguuuuaca 1620
 guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcuggcccag ccaaaccug 1680
 ucugacaacc ucuuuggugaa ccuuaguacc uaaaaggaaa ucucaccca ucccacacc 1740
 uggaggauuu caucucuugu auaugaugau cuggauccac caagacuugu uuuaugcua 1800
 gggucaauuu cuuuuuuucu uuuuuuuuuu uuuuuuucu uucuuugaga cugggucucg 1860
 cuuuguugcc caggcuggag uggaguggcg ugaucuuggc uuacugcagc cuuugccucc 1920
 ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc 1980
 auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agaugggguc ucacaguguu gccaggcug 2040
 gucucaaacu ccugggcua ggcgauccac cugucucagc cuccagagu gcugggauua 2100
 caauugugag ccaccaguc cagcuggaag ggucaacauc uuuuacauc ugcaagcaca 2160
 ucugcauuuu cccccaccc uucccuccu ucuccuuuu uauauccau uuuuauaucg 2220
 aucucuuaau uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g 2271

<210> 6

<211> 2404

<212> RNA

<213> 人

<400> 6

ugaggccagg agauggaggc ugcagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag 60
 ugacagagca agaccuauuc ucaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag 120
 acgccaacuc ucucuagcuc gcuagugggu ugcaggaggu gcuuacgau guuuguuucu 180
 uuugcuccgu cuuccaguug cuuuauucgu ucacuugugc ccugacuuc aacucugucu 240
 ccuuccucuu ccuacaguac ucccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga 300
 ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcacccgc guccgcgcca 360
 uggccaucua caagcaguca cagcacauga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug 420
 agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuaucgga guggaaggaa 480
 auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugcccu 540
 augagccgcc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaaca 600
 guuccugcau gggcggcaug aaccggaggc ccauccucac caucauca cuggaagacu 660
 ccagugguaa ucuacuggga cggaacagcu uuagggugcg uguuugugcc uguccuggga 720
 gagaccggcg cacagaggaa gagaauccuc gcaagaaagg ggagccucac cagcagcugc 780
 cccaggggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucucc cagccaaaga 840
 agaaaccacu ggauggagaa uauuuacccc uucaggacca gaccagcuu caaaaagaaa 900
 auuguuaaag agagcaugaa aaugguucua ugacuugcc ugauacagau gcuacuugac 960
 uuacgauggu guuacuuccu gauaaacucg ucguaaguug aaaauuuau ccgugggcgu 1020

gagcgcuucg agauguuccg agagcugaau gaggccuugg aacucaagga ugcccaggcu 1080
 gggaaggagc caggggggag cagggcucac uccagccacc ugaaguccaa aaaggguacag 1140
 ucuaccuccc gccauaaaaa acucauguuc aagacagaag ggccugacuc agacugacau 1200
 ucuccacuuc uuguucccca cugacagccu cccaccccca ucucucccuc cccugccauu 1260
 uuggguuuug ggucuuugaa cccuugcuug caauaggugu gcgucagaag caccaggac 1320
 uuccauuugc uuugucccg ggcuuccacug aacaaguugg ccugcacugg uguuuuguug 1380
 uggggaggag gauggggagu aggacauacc agcuuagauu uuaagguuuu uacugugagg 1440
 gauguuuggg agauguuaga aauguucuug caguuaaggg uuaguuuaca aucagccaca 1500
 uucuaagguag gggcccacuu caccguacua accagggaag cugucccua cuguugaauu 1560
 uucucuaacu ucaaggccca uaucugugaa augcuggcgu uugcaccuac cucacagagu 1620
 gcauugugag gguaaauugaa auaauguaca ucuggccuug aaaccaccuu uuauuacaug 1680
 gggucuagaa cuugaccccc uugagggugc uuguucccuc ucccuguugg ucgguggguu 1740
 gguaguuuuc acaguugggc agcugguuag guagaggag uugucaaguc ucugcuggcc 1800
 cagccaaacc cugucugaca accucuuggu gaaccuuagu accuaaaagg aaaucucacc 1860
 ccaucccaca cccuggagga uuucaucucu uguauaugau gaucuggauc caccaagacu 1920
 uguuuuauug ucagggucaa uuucuuuuuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uuuuucuuug 1980
 agacuggguc ucgcuuuguu gcccaggcug gaguggagug gcgugaucuu ggcuuacugc 2040
 agccuuugcc uccccggcuc gagcaguccu gccucagccu ccggaguagc ugggaccaca 2100
 gguucaugcc accauggcca gccaacuuuu gcauguuuug uagagauggg gucucacagu 2160
 guugcccagg cuggucuaa acuccugggc ucaggcgau caccugucuc agccucccag 2220
 agugcuggga uuacaauugu gagccaccac guccagcugg aagggucaac aucuuuuaa 2280
 uucugcaagc acaucugcau uuucacccca cccuuccccu ccuucuccu uuuuauaucc 2340
 cauuuuuaua ucgaucucu auuuuacaau aaaacuuggc ugccaccugu gugucugagg 2400
 ggug 2404

<210> 7

<211> 2331

<212> RNA

<213> 人

<400> 7

ugaggccagg agauggagc ugcagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag 60
 ugacagagca agaccuauuc ucaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag 120
 acgccaacuc ucucuagcuc gcuagugggu ugcaggaggu gcuuacgau guuuguuuu 180
 uugcugccgu cuuccaguug cuuuauucugu ucacuuguc ccugacuuc aacucugucu 240
 ccuuccucuu ccuacaguac uccccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga 300
 ccugcccugu gcagcugugg guugauucca ccccccgcc cggcaccgc guccgcgcca 360
 uggccauua caagcaguca cagcacauga cggagguugu gaggcgcugc cccaccaug 420
 agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuaucgga guggaaggaa 480
 auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugccu 540
 augagccgcc ugagguuggc ucugacugua ccaccauca cuacaacuac auguguaaca 600

guuccugcau gggcgggcaug aaccggaggc ccauccucac caucaucaca cuggaagacu 660
 ccagugguaa ucuacuggga cggaacagcu uugaggugcg uguuugugcc uguccuggga 720
 gagaccggcg cacagaggaa gagaauccucc gcaagaaagg ggagccucac cagcagcugc 780
 ccccgaggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucuccc cagccaaaga 840
 agaaaccacu ggauggagaa uauuucaccc uucagaugcu acuugacuua cgaugguguu 900
 acuuccugau aaacucgucg uaaguugaaa auauuauccg ugggcgugag cgcuucgaga 960
 uguuccgaga gcugaaugag gccuuggaac ucaaggaucc ccaggcuggg aaggagccag 1020
 gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accuccgcc 1080
 auaaaaaacu cauguucaag acagaagggc cugacucaga cugacauucu ccacuucuug 1140
 uccccacug acagccuccc acccccacuc cuccuccccc ugccauuuug gguuuugggu 1200
 cuuugaaccc uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuc cauugcuuu 1260
 guccgggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuguugugg ggaggaggau 1320
 ggggaguagg acauaccagc uuagauuuua agguuuuuac ugugagggau guuugggaga 1380
 uguaagaaau guucuuugcag uuaaggguaa guuuacauc agccacauuc uagguagggg 1440
 cccacuucac cguacuaacc agggaagcug ucccucacug uugaauuuuc ucuaacuua 1500
 aggcccauau cugugaaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uuugagggu 1560
 uaaugaaaua auguacauuc ggccuugaaa ccaccuuuaa uuacaugggg ucuagaacuu 1620
 gacccccuug agggugcuug ucccucucc cuguuggucg guggguuggu aguucuaa 1680
 guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcuggcccag ccaaaccug 1740
 ucugacaacc ucuuggugaa ccuuaguacc uaaaaggaaa ucucaccca ucccacacc 1800
 uggaggauuu caucucuugu auaugaugau cuggauccac caagacuugu uuuaugcuca 1860
 gggucaauuu cuuuuuucuu uuuuuuuuuu uuuuuucuuu uucuuugaga cugggucucg 1920
 cuuuguugcc caggcuggag uggaguggcg ugaucuuaggc uuacugcagc cuuugccucc 1980
 ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc 2040
 auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agaugggguc ucacaguguu gcccaggcug 2100
 gucucaaacu ccugggcuca ggcgauccac cugucucagc cuccagagu gcugggauua 2160
 caauugugag ccaccacguc cagcuggaag ggucaacauc uuuuacauuc ugcaagcaca 2220
 ucugauuuu caccaccacc uuccccuccu ucuccuuuuu uauaucccau uuuuauaucg 2280
 aucucuuaau uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g 2331

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 8

cagaccuaug gaaacuacu 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 9
ggauguuugg gagauguaa 19
<210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 10
gacucagacu gacauucua 19
<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 11
ggguugguag uuucuacaa 19
<210> 12
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 12
gggauguuug ggagaugua 19
<210> 13
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 13
ggauccacca agacuugua 19
<210> 14

<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 14
gagggauguu ugaggagaua 19
<210> 15
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 15
gggccugacu cagacugaa 19
<210> 16
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 16
gacucagacu gacauucuu 19
<210> 17
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 17
gcauuugcac cuaccucaa 19
<210> 18
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 18
ggauguuugg gagauguau 19

<210> 19
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 19
gggccugacu cagacugau 19
<210> 20
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 20
cagaccuaug gaaacuaca 19
<210> 21
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 21
aguaguuuucc auaggucug 19
<210> 22
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 22
uuacaucucc caaacaucc 19
<210> 23
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 23

uagaauguca gucugaguc 19

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 24

uuguagaaac uaccaaccc 19

<210> 25

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 25

uacaucucucc aaacaucucc 19

<210> 26

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 26

uacaagucuu gguggaucc 19

<210> 27

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 27

uauucucccaa acaucccuc 19

<210> 28

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 28
uucagucuga gucaggccc 19
<210> 29
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 29
aagaauguca gucugaguc 19
<210> 30
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 30
uugagguagg ugcaaaugc 19
<210> 31
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 31
auacaucucc caaacaucc 19
<210> 32
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 32
aucagucuga gucaggccc 19
<210> 33
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 化学合成
<400> 33
uguaguuuucc auaggucug 19
<210> 34
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 34
ccgaguggaa ggaaaauug 19
<210> 35
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 35
caaauuuccu uccacucgg 19
<210> 36
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 36
gagaauauuu cacccuuc 19
<210> 37
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 化学合成
<400> 37
ugaaggguga aaauuucuc 19

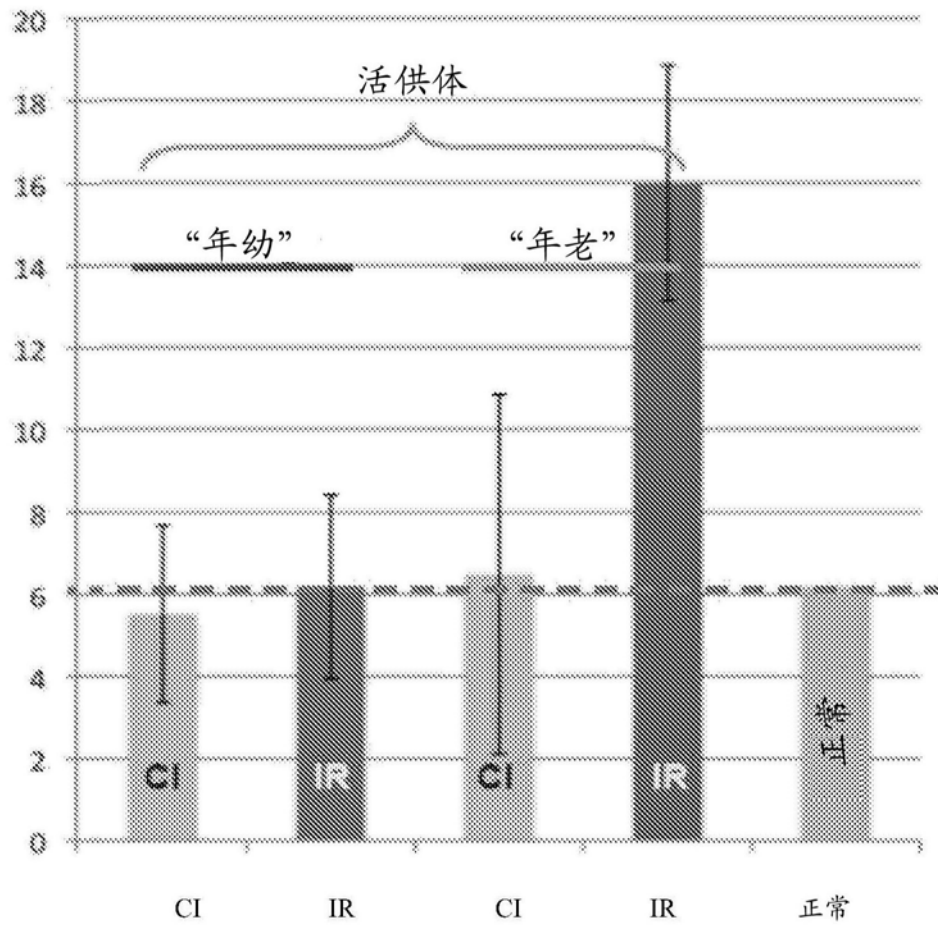


图1

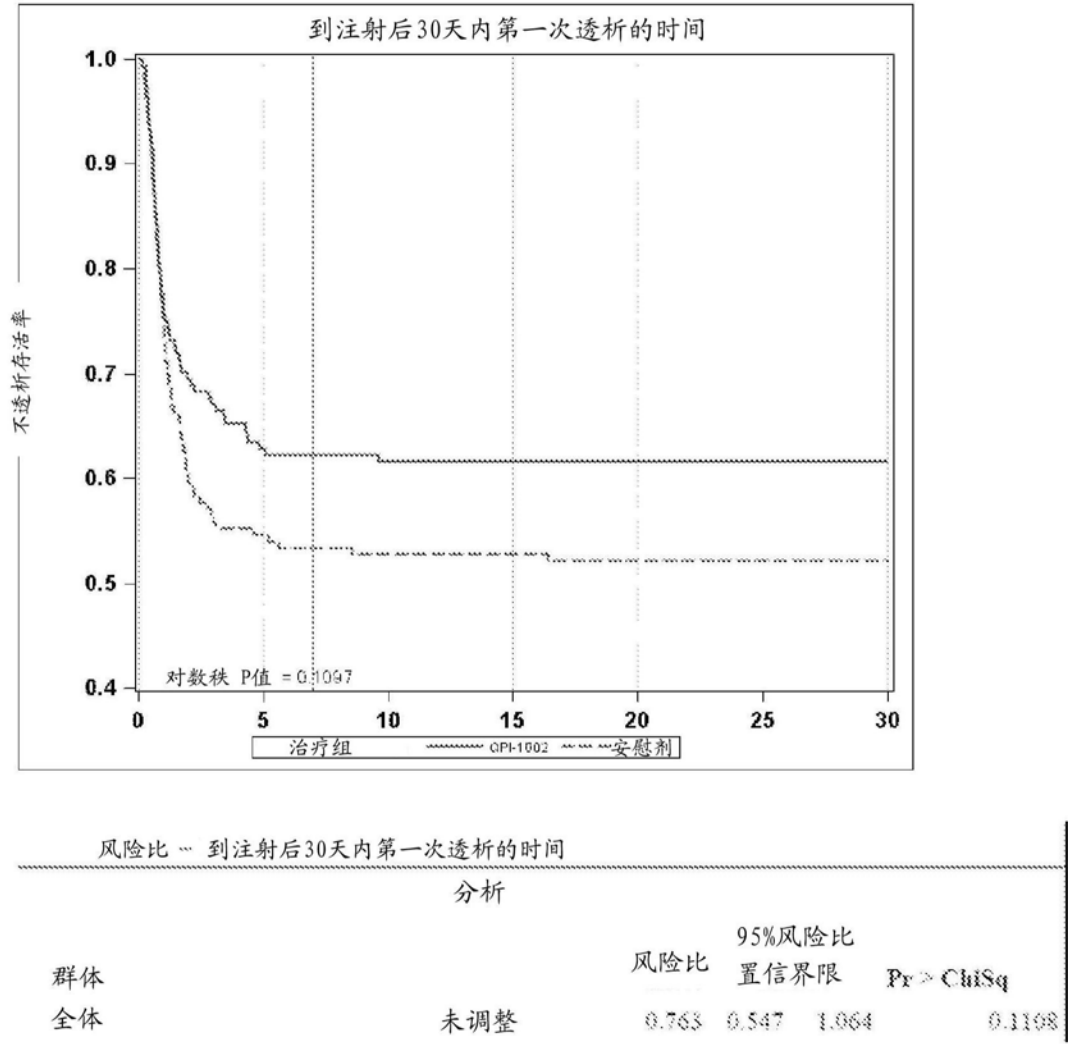
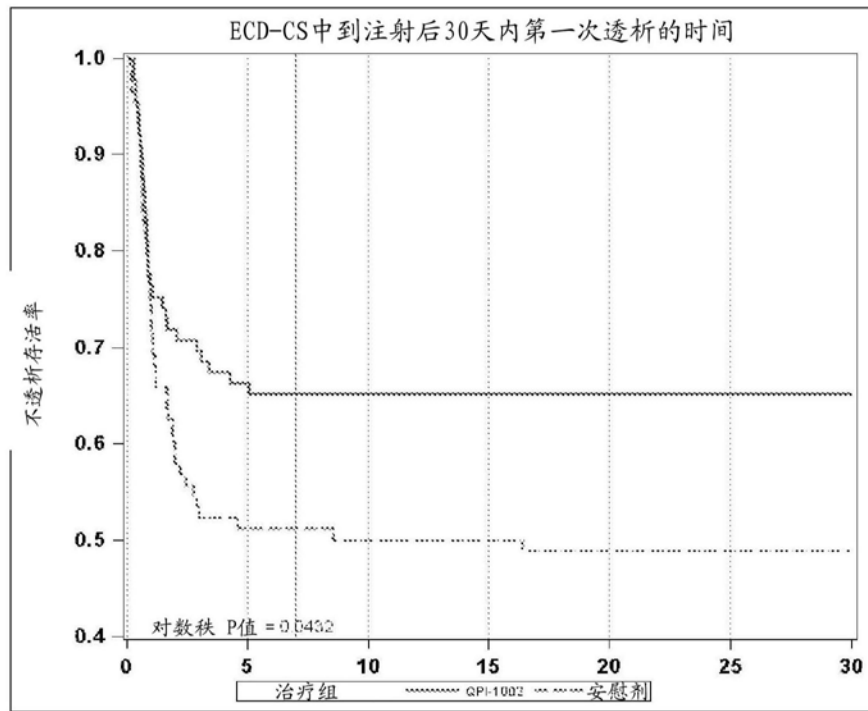


图2a



风险比 到注射后30天内第一次透析的时间		分析			
群体		风险比	95%风险比 置信界限		Pr > ChiSq
ECD CS	未调整	0.626	0.396	0.990	0.0451

图2b

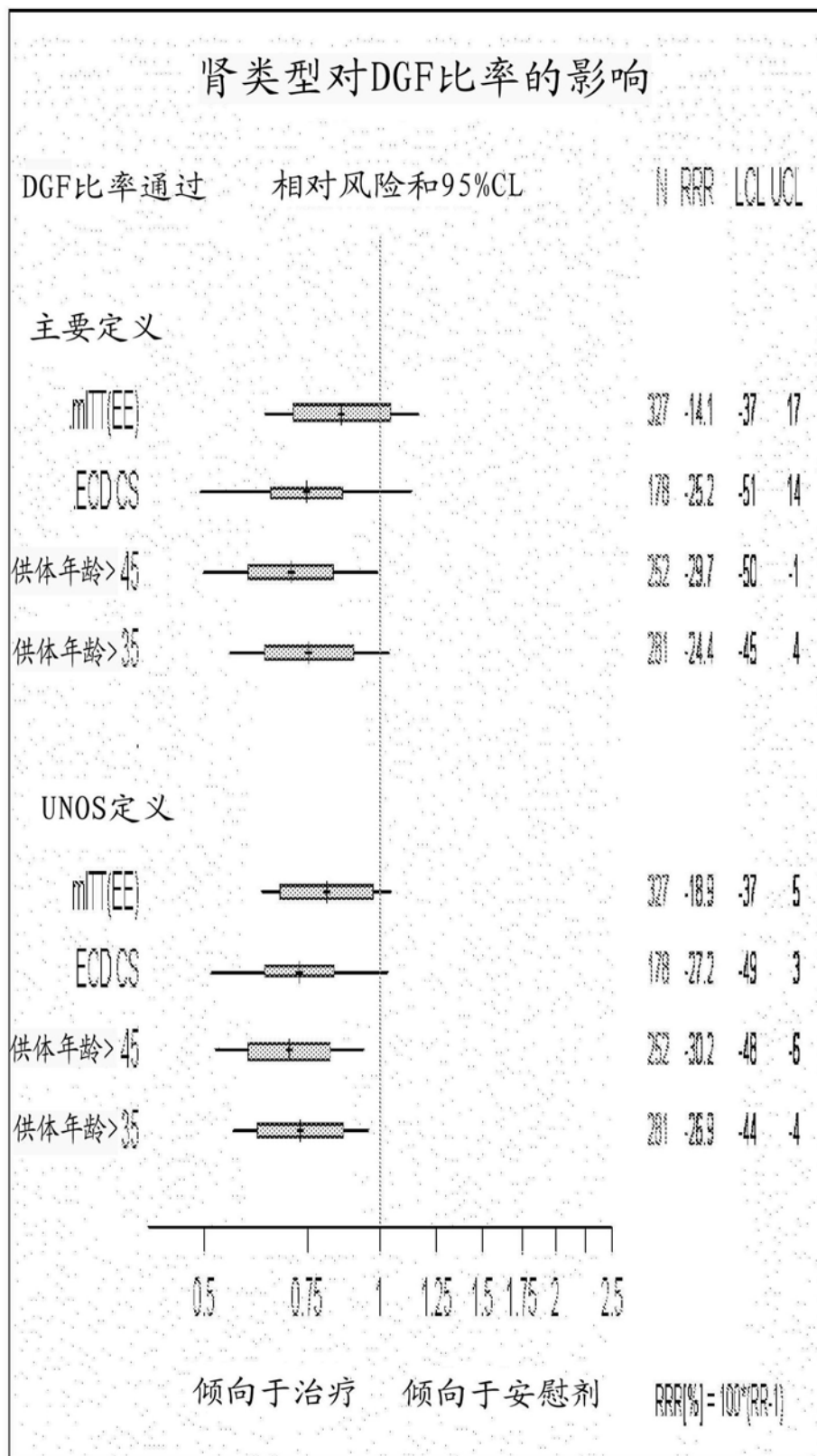


图3