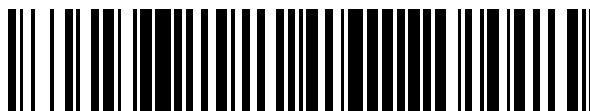


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 157**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 10163499 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2223692**

54 Título: **Inhibición mediante iARN de la expresión de alfa-ENaC**

30 Prioridad:

15.06.2007 EP 07110376

13.08.2007 EP 07114265

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**VAN HEEKE, GINO;
HICKMAN, EMMA;
DANAHAY, HENRY LUKE;
TAN, PAMELA;
GEICK, ANKE y
VORNLOCHER, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 432 157 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibición mediante iARN de la expresión de alfa-ENaC

Campo técnico

5 La invención se refiere al campo del transporte de iones en las vías respiratorias mediado por ENaC y a composiciones y a métodos para modular la expresión de alfa-ENaC, y más particularmente a la regulación por disminución de alfa-ENaC por oligonucleótidos a través de interferencia por ARN que se administran localmente a los pulmones y el conducto nasal a través de inhalación/administración intranasal, o se administran sistémicamente, por ejemplo mediante inyección intravenosa.

Antecedentes

10 La interferencia por ARN o "iARN" es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación de que ARN bicatenario (ARN_{bc}) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire *et al.*, Nature 391: 806-811, 1998). El ARN_{bc} corto dirige el silenciamiento postranscripcional, específico de genes en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función génica. Esta tecnología se ha revisado numerosas veces recientemente, véanse, por ejemplo Novina, C.D.: 15 y Sharp, P., Nature 2004, 430:161, y Sandy, P., *et al.*, Biotechniques 2005, 39:215.

Las superficies mucosas en la superficie de contacto entre el entorno y el cuerpo han hecho evolucionar varios mecanismos protectores. Una forma principal de tal defensa innata es limpiar estas superficies con líquido. Normalmente, la cantidad de la capa de líquido en una superficie mucosa refleja el equilibrio entre la secreción líquida epitelial, que a menudo refleja la secreción de aniones (Cl⁻ y/o HCO₃⁻) acoplada con agua (y un contraión catiónico) y la absorción de líquido epitelial, que a menudo refleja la absorción de Na⁺, acoplada con agua y contra- 20 anión (Cl⁻ y/o HCO₃⁻). Muchas enfermedades de las superficies mucosas están provocadas por demasiado poco líquido protector en esas superficies mucosas creado por un desequilibrio entre la secreción (demasiado poca) y la absorción (relativamente demasiada). Los procesos de transporte salino defectuosos que caracterizan estas disfunciones mucosas residen en la capa epitelial de la superficie mucosa. Un enfoque para reponer la capa de líquido protector en las superficies mucosas es "reequilibrar" el sistema bloqueando la absorción de líquido mediada por el canal de Na⁺. La proteína epitelial que media la etapa limitante de la velocidad de la absorción de Na⁺ y líquido es el canal de Na⁺ epitelial (ENaC). Alfa-ENaC está situado en la superficie apical del epitelio, es decir, la superficie de contacto entre superficie mucosa-entorno. La inhibición de la absorción de líquido mediada por Na⁺ mediada por alfa-ENaC puede obtener utilidad terapéutica. Por tanto, existe la necesidad del desarrollo de terapias eficaces para el tratamiento y la prevención de enfermedades o trastornos en los que está implicado alfa-ENaC, por ejemplo fibrosis quística en seres humanos y animales, y particularmente para terapias con alta eficacia. Un requisito previo para la alta eficacia es que el principio activo no se degrade demasiado rápido en un entorno fisiológico. 25 30

Li Tianbo *et al.* describen cómo la interferencia por ARN de alfa-ENaC inhibe la absorción de fluidos de pulmón de rata *in vivo*, Am Journal of Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L649-L660, 2006.

35 Sumario

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de ARNi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en la que:

40 a. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND8396 (SEQ ID NO: 223) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de ND8396 (SEQ ID NO: 224); o

b. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND8612 (SEQ ID NO: 527) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de ND8612 (SEQ ID NO: 528); o

45 c. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND10781 (SEQ ID NO: 1281) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 ó 3 nucleótidos de la hebra antisentido de ND10781 (SEQ ID NO: 1282).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de ARNi para alfa-ENaC, en la que el agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido,

50 en la que la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste en ND8396 (SEQ ID NO: 223), ND8612 (SEQ ID NO: 527) y ND10781 (SEQ ID

NO: 1281) y en la que la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste en ND8396 (SEQ ID NO: 224), ND8612 (SEQ ID NO: 528) y ND10781 (SEQ ID NO: 1282),

comprendiendo además la composición un ligando de receptor epitelial.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de ARNi, tal como se describió anteriormente en el presente documento, para su uso en terapia.

Las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones de agente de ARNi pueden usarse con cualquier dosificación y/o formulación descritas en el presente documento, así como con cualquier vía de administración descrita en el presente documento.

- 10 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de esta descripción, los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

En las figuras:

Figura 1: Mapa de digestos de restricción del constructo pXoon para α -EnaC de macaco clonado.

- 15 Figura 2: Secuencia de proteína y de ADN de alfa-EnaC de macaco.

Figura 3: Clonación de los sitios de reconocimiento inespecíficos y específicos predichos en el constructo indicador de luciferasa doble AY535007. Los fragmentos consisten en 19 nt del sitio diana predicho y 10 nt de secuencia flanqueante en ambos extremos 5' y 3'.

Descripción detallada

- 20 Para facilidad de exposición, el término "nucleótido" o "ribonucleótido" se usa a veces en el presente documento en referencia a una o más subunidades monoméricas de un agente de ARN. Se entenderá que la utilización del término "ribonucleótido" o "nucleótido" en el presente documento también puede referirse, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, a un nucleótido modificado, o resto de reemplazo sustituto, tal como se describe adicionalmente a continuación, en una o más posiciones.

- 25 Un "agente de ARN" tal como se usa en el presente documento, es un ARN no modificado, ARN modificado, o sustituto de nucleósido, cada uno de los cuales se describen en el presente documento o se conocen bien en la técnica de síntesis de ARN. Aunque se describen numerosos ARN modificados y sustitutos de nucleósido, los ejemplos preferidos incluyen los que tienen mayor resistencia a la degradación por nucleasas que la que tienen los ARN no modificados. Los ejemplos preferidos incluyen los que tienen una modificación con azúcar en 2', una
30 modificación en una proyección monocatenaria, preferiblemente una proyección monocatenaria en 3', o, particularmente si es monocatenario, una modificación en 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

- Un "agente de ARNi" (abreviatura para "agente de ARN interferente") tal como se usa en el presente documento, es un agente de ARN, que puede regular por disminución la expresión de un gen diana, por ejemplo el gen de ENaC
35 SCNN1A. Aunque no se desea limitarse por la teoría, un agente de ARNi puede actuar mediante uno o más de varios mecanismos, incluyendo la escisión postranscripcional de un ARNm diana denominado a veces en la técnica iARN, o mecanismos pretranscripcionales o pretraduccionales.

- Un "agente de ARNi bc" (abreviatura para "agente de ARNi bicatenario"), tal como se usa en el presente documento, es un agente de ARNi que incluye más de una, y preferiblemente dos, hebras en las que la hibridación intercatenaria
40 puede formar una región de estructura de dúplex. Una "hebra" se refiere en el presente documento a una secuencia de nucleótidos contiguos (incluyendo nucleótidos que no se producen de manera natural o modificados). Las dos o más hebras pueden ser, o cada una formar parte de, moléculas separadas, o pueden estar interconectadas covalentemente, por ejemplo, mediante un ligador, por ejemplo, un ligador de polietilenglicol, para formar una molécula. Al menos una hebra puede incluir una región que es suficientemente complementaria a un ARN diana. Tal
45 hebra se denomina "hebra antisentido." Una segunda hebra del agente de ARNbc, que comprende una región complementaria a la hebra antisentido, se denomina "hebra sentido." Sin embargo, un agente de ARNi bc también puede formarse a partir de una única molécula de ARN que es al menos parcialmente autocomplementaria, formando, por ejemplo, una estructura de horquilla o mango de sartén, incluyendo una región de dúplex. Estas últimas se denominan en el presente documento ARN de horquilla cortos o ARNhc. En tal caso, el término "hebra"
50 se refiere a una de las regiones de la molécula de ARN que es complementaria a otra región de la misma molécula de ARN.

Aunque, en células de mamífero, los agentes de ARNi bc largos pueden inducir la respuesta de interferón que es frecuentemente perjudicial, los agentes de ARNi bc cortos no desencadenan la respuesta de interferón, al menos no en un grado que sea perjudicial para la célula y/o el huésped (Manche *et al.*, Mol. Cell. Biol. 12:5238, 1992; Lee *et al.*, Virology 199:491, 1994; Castelli *et al.*, J. Exp. Med. 186:967, 1997; Zheng *et al.*, ARN 10:1934, 2004; Heidel *et al.*, Nature Biotechnol. 22 1579). Los agentes de ARNi incluyen moléculas que son suficientemente cortas que no desencadenan una respuesta de interferón no específica perjudicial en células de mamífero normales. Por tanto, puede usarse la administración de una composición que incluye un agente de ARNi (por ejemplo, formulado tal como se describe en el presente documento) a un sujeto para disminuir la expresión de alfa-ENaC en el sujeto, a la vez que se sortea una respuesta de interferón. Las moléculas que son lo suficientemente cortas que no desencadenan una respuesta de interferón perjudicial se denominan agentes de ARNic o ARNic en el presente documento. “Agente de ARNic” o “ARNic” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi bc, que es suficientemente corto que no induce una respuesta de interferón perjudicial en un mamífero, y particularmente una célula humana, por ejemplo, tiene una región de dúplex de menos de 60 pero preferiblemente menos de 50, 40 ó 30 pares de nucleótidos.

Los agentes de ARNi aislados descritos en el presente documento, incluyendo agentes de ARNi bc y agentes de ARNic, pueden mediar la expresión disminuida de alfa-ENaC, por ejemplo, mediante degradación de ARN. Por conveniencia, tal ARN también se denomina en el presente documento ARN que va a silenciarse. Un ácido nucleico de este tipo también se denomina “ARN diana”, a veces “molécula de ARN diana” o a veces “gen diana”.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “media iARN” se refiere a la capacidad de un agente para silenciar, de manera específica de la secuencia, un gen diana. “Silenciamiento de un gen diana” significa el proceso mediante el cual una célula que contiene y/o que expresa un determinado producto del gen diana cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o expresará al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o el 90% menos de tal producto génico cuando está en contacto con el agente, en comparación con una célula similar que no ha estado en contacto con el agente. Tal producto del gen diana puede ser, por ejemplo, un ARN mensajero (ARNm), una proteína o un elemento regulador.

Tal como se usa en el presente documento, el término “complementario” se usa para indicar un grado de complementariedad suficiente de manera que se produce la unión estable y específica entre un compuesto y una molécula de ARN diana, por ejemplo, ARNm de alfa-ENaC. La unión específica requiere un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias que no son diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos. Las secuencias que no son diana difieren normalmente de las secuencias diana en al menos 2, 3 ó 4 nucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, un agente de ARNi es “suficientemente complementario” a un ARN diana, por ejemplo, un ARNm diana (por ejemplo, ARNm de alfa-ENaC) si el agente de ARNi reduce la producción de una proteína codificada por el ARN diana en una célula. El agente de ARNi también puede ser “exactamente complementario” al ARN diana, por ejemplo, el ARN diana y el agente de ARNi se aparean, preferiblemente para formar un híbrido compuesto exclusivamente por pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un agente de ARNi “suficientemente complementario” puede incluir una región interna (por ejemplo, de al menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria a un ARN de alfa-ENaC diana. Además, en algunas realizaciones, el agente de ARNi distingue específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el agente de ARNi sólo media la iARN si se encuentra complementariedad exacta en la región (por ejemplo, dentro de 7 nucleótidos de) la diferencia de un solo nucleótido. Agentes de ARNi preferidos se basarán en o consistirán en o comprenderán las secuencias sentido y antisentido proporcionadas en las tablas 1A-1D.

Tal como se usa en el presente documento, “esencialmente idéntico” cuando se usa en referencia a una primera secuencia de nucleótidos en comparación con una segunda secuencia de nucleótidos significa que la primera secuencia de nucleótidos es idéntica a la segunda secuencia de nucleótidos excepto por hasta una, dos o tres sustituciones de nucleótido (por ejemplo, adenosina reemplazada por uracilo). “Que conserva esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas,” tal como se usa en el presente documento en referencia a un agente de ARNi no idéntico a pero derivado de uno de los agentes de ARNi de las tablas 1A-1D mediante delección, adición o sustitución de nucleótidos, significa que el agente de ARNi derivado presenta una actividad inhibitoria de no menos del 20% de la actividad inhibitoria del agente de ARNi de las tablas 1A-1D a partir del que se derivó. Por ejemplo, un agente de ARNi derivado de un agente de ARNi de las tablas 1A-1D que disminuye la cantidad de ARNm de alfa-ENaC presente en células humanas cultivadas en el 70% puede disminuir por sí mismo la cantidad de ARNm presente en células humanas cultivadas en al menos el 50% con el fin de que se considere que conserva esencialmente la capacidad para inhibir la replicación de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Opcionalmente, un agente de ARNi puede disminuir la cantidad de ARNm de alfa-ENaC presente en células humanas cultivadas en al menos el 50%.

Tal como se usa en el presente documento, un “sujeto” se refiere a un organismo mamífero que se somete a tratamiento para un trastorno mediado por alfa-ENaC. El sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como una vaca, un caballo, un ratón, una rata, un perro, un cerdo, una cabra o un primate. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano.

5 Diseño y selección de agentes de ARNi

Tal como se usa en el presente documento, “trastornos asociados con la expresión de alfa-ENaC” se refiere a cualquier estado biológico o patológico que (1) está mediado al menos en parte por la presencia de alfa-ENaC y (2) cuyo desenlace puede verse afectado al reducirse el nivel del alfa-ENaC presente. Se indican a continuación trastornos específicos asociados con la expresión de alfa-ENaC.

10 La presente descripción se basa en el diseño, la síntesis y la generación de agentes de ARNi que seleccionan como diana alfa-ENaC y la demostración del silenciamiento del gen de alfa-ENaC *in vitro* en células cultivadas tras la incubación con un agente de ARNi, y el efecto protector resultante hacia los trastornos mediados por alfa-ENaC.

15 Un agente de ARNi puede diseñarse de manera racional basándose en información de secuencia y características deseadas. Por ejemplo, un agente de ARNi puede diseñarse según la temperatura de fusión relativa del dúplex candidato. Generalmente, el dúplex debe tener una menor temperatura de fusión en el extremo 5' de la hebra antisentido que en el extremo 3' de la hebra antisentido.

La presente descripción proporciona composiciones que contienen ARNic y/o ARNhc dirigidos a uno o más transcritos de alfa-ENaC.

20 Para cualquier diana génica particular que se seleccione, el diseño de ARNic o ARNhc para su uso según la presente descripción seguirá preferiblemente determinadas directrices. Además, en muchos casos, el agente que se suministra a una célula según la presente descripción puede someterse a una o más etapas de procesamiento antes de convertirse en un agente supresor activo (véase a continuación para un análisis adicional); en tal casos, los expertos habituales en la técnica apreciarán que el agente relevante estará diseñado preferiblemente para incluir secuencias que pueden ser necesarias para su procesamiento.

25 Las enfermedades mediadas por disfunción del canal de sodio epitelial, incluyen enfermedades asociadas con la regulación de volúmenes de fluido a través de membranas epiteliales. Por ejemplo, el volumen de líquido de superficie de las vías respiratorias es un regulador clave del aclaramiento mucociliar y el mantenimiento de la salud de los pulmones. El bloqueo del canal de sodio epitelial promoverá la acumulación de fluido en el lado mucoso del epitelio de las vías respiratorias, promoviendo de ese modo el aclaramiento de mucosidad e impidiendo la
30 acumulación de mucosidad y esputo en tejidos respiratorios (incluyendo las vías respiratorias pulmonares). Tales enfermedades incluyen enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, infecciones de las vías respiratorias (agudas y crónicas; víricas y bacterianas) y carcinoma de pulmón. Las enfermedades mediadas por el bloqueo del canal de sodio epitelial también incluyen enfermedades distintas a las enfermedades respiratorias que se asocian con la
35 regulación anómala de fluidos a través de un epitelio, que implica quizá una fisiología anómala de los líquidos de superficie protectores en su superficie, por ejemplo, xerostomía (sequedad de boca) o queratoconjuntivitis seca (sequedad de ojos). Además, podría usarse el bloqueo del canal de sodio epitelial en el riñón para promover la diuresis e inducir de ese modo un efecto hipotensivo.

El tratamiento puede ser sintomático o profiláctico.

40 El asma incluye tanto asma intrínseca (no alérgica) como asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma ocupacional y asma inducida tras infección bacteriana. Ha de entenderse también que tratamiento del asma abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 ó 5 años de edad, que presentan síntomas de sibilancia y están diagnosticados o pueden diagnosticarse como “lactantes sibilantes”, una categoría de pacientes establecida de importante preocupación médica y ahora
45 identificado a menudo como asmáticos incipientes o de fase temprana. (Por conveniencia este estado asmático particular se denomina “síndrome del lactante sibilante”).

La eficacia profiláctica en el tratamiento de asma se evidenciará por la frecuencia o gravedad reducida del ataque sintomático, por ejemplo, de ataque broncoconstrictor o asmático agudo, la mejora en la función pulmonar o la mejora de la hiperreactividad de las vías respiratorias. Puede evidenciarse además por el requisito reducido de otra
50 terapia sintomática, es decir, terapia para o destinada a restringir o suprimir el ataque sintomático cuando se produce, por ejemplo, antiinflamatoria (por ejemplo, con corticosteroides) o broncodilatadora. El beneficio profiláctico en el asma puede ser evidente, en particular, en sujetos propensos a “baja matutina”. “La baja matutina” es un síndrome asmático reconocido, común en un porcentaje sustancial de asmáticos y caracterizado por un ataque de asma, por ejemplo, entre las horas de aproximadamente 4-6 a.m., es decir, normalmente a una hora

sustancialmente distante de cualquier terapia para asma sintomática administrada previamente.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluye bronquitis crónica o disnea asociadas con la misma, enfisema, así como agravamiento de la hiperreactividad de las vías respiratorias como resultado de otra terapia farmacológica, en particular, otra terapia farmacológica inhalada. La descripción también puede aplicarse al tratamiento de bronquitis de cualquier tipo o génesis incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda, araquídica, catarral, pseudomembranosa, crónica o ftiinoide.

Basándose en los resultados mostrados en el presente documento, la presente descripción proporciona agentes de ARNi que reducen la expresión de alfa-ENaC en células cultivadas y en un sujeto, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un ser humano. Las tablas 1A-1D proporcionan agentes de ARNi que seleccionan como diana alfa-ENaC a modo de ejemplo, basándose en las abreviaturas de nomenclaturas convencionales facilitadas en la tabla A.

La tabla 1A, Seq. Id No. 305-608, la tabla 1B y la tabla 1D, Seq. Id No. 1519-1644 enumeran ARNic que no comprenden modificaciones de nucleótido excepto por una unión fosforotioato entre las timidinas 3'-terminales y las penúltimas. Las Seq Id restantes en las tablas 1A-1D enumeran ARNic en los que todos los nucleótidos que comprenden bases piridimínicas son 2'-O-metil-nucleótidos modificados en la hebra sentido, y todas las uridinas en un contexto de secuencia de 5'-ua-3' así como todas las citidinas en un contexto de secuencia de o 5'-ca-3' son 2'-O-metil-nucleótidos modificados en la hebra antisentido.

Basándose en estos resultados, la descripción proporciona específicamente un agente de ARNi que incluye una hebra sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias de hebra sentido de los agentes proporcionados en las tablas 1A-1D, y una hebra antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias antisentido de los agentes proporcionados en las tablas 1A-1D.

Los agentes de ARNi mostrados en las tablas 1A-1D se componen de dos hebras de 19 nucleótidos de longitud que son complementarias o idénticas a la secuencia diana, más una proyección 3'-TT. La presente descripción proporciona agentes que comprenden al menos 15, o al menos 16, 17 ó 18 ó 19 nucleótidos contiguos de estas secuencias. Sin embargo, aunque estas longitudes pueden ser potencialmente óptimas, los agentes de ARNi no pretenden limitarse a estas longitudes. El experto es muy consciente de que agentes de ARNi más cortos o más largos pueden ser eficaces de manera similar, puesto que, dentro de determinados intervalos de longitud, la eficacia es más bien una función de la secuencia de nucleótidos que de la longitud de hebra. Por ejemplo, Yang, *et al.*, PNAS 99:9942-9947 (2002), demostraron eficacias similares para agentes de ARNi de longitudes de entre 21 y 30 pares de bases. Otros han mostrado el silenciamiento eficaz de genes por agentes de ARNi hasta una longitud de aproximadamente 15 pares de bases (Byrom, *et al.*, "Inducing RNAi with siRNA Cocktails Generated by RNase III" Tech Notes 10(1), Ambion, Inc., Austin, TX).

Por tanto, es posible y se contempla seleccionar de las secuencias proporcionadas en las tablas 1A-1D, una secuencia parcial de entre 15 y 19 nucleótidos para la generación de un agente de ARNi derivado de una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1A-1D. Alternativamente, pueden añadirse uno o varios nucleótidos a una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1A-1D, o un agente que comprende 15 nucleótidos contiguos de uno de estos agentes, preferiblemente, pero no necesariamente, de tal modo que los nucleótidos añadidos son complementarios a la secuencia respectiva del gen diana, por ejemplo, alfa-ENaC. Por ejemplo, los primeros 15 nucleótidos de uno de los agentes pueden combinarse con los 8 nucleótidos que se encuentran en 5' con respecto a esta secuencia en ARNm de alfa-ENaC para obtener un agente con 23 nucleótidos en las hebras sentido y antisentido. Todos de tales agentes de ARNi derivados están incluidos en los agentes de ARNi, siempre que conserven esencialmente la capacidad para inhibir la replicación de alfa-ENaC en células humanas cultivadas.

La hebra antisentido de un agente de ARNi debe ser igual a o al menos de, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Debe ser igual a o de menos de 60, 50, 40 ó 30, nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15-30, 17 a 25, 19 a 23 y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La hebra sentido de un agente de ARNi debe ser igual a o al menos de, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Debe ser igual a o de menos de 60, 50, 40 ó 30 nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15-30, 17 a 25, 19 a 23 y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La parte bicatenaria de un agente de ARNi debe ser igual a o al menos de, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 ó 50 pares de nucleótidos de longitud. Debe ser igual a o de menos de 60, 50, 40 ó 30 pares de nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15-30, 17 a 25, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud.

Generalmente, los agentes de ARNi incluyen una región de suficiente complementariedad con el ARNm de alfa-ENaC, y son de suficiente longitud en cuanto a nucleótidos, que el agente de ARNi, o un fragmento del mismo, pueda mediar la regulación por disminución del gen de alfa-ENaC. No es necesario que exista una complementariedad perfecta entre el agente de ARNi y el gen diana, pero la correspondencia debe ser suficiente

como para permitir que el agente de ARNi, o un producto de escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de la secuencia, por ejemplo, mediante escisión por iARN de un ARNm de alfa-ENaC.

Por tanto, los agentes de ARNi incluyen agentes que comprenden una hebra sentido y hebra antisentido, que comprenden, cada una, una secuencia de al menos 16, 17 ó 18 nucleótidos que es esencialmente idéntica, tal como se define a continuación, a una de las secuencias de las tablas 1A-1D, excepto porque no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos por hebra, respectivamente, se han sustituido por otros nucleótidos (por ejemplo, adenosina reemplazada por uracilo), a la vez que conservan esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Estos agentes presentarán, por tanto, al menos 15 nucleótidos idénticos a una de las secuencias de las tablas 1A-1D, pero se introducen 1, 2 ó 3 apareamientos erróneos de bases con respecto o bien la secuencia de alfa-ENaC diana o bien entre las hebras sentido y antisentido. Los apareamientos erróneos con respecto a la secuencia de ARN de alfa-ENaC diana, particularmente en la hebra antisentido, se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, están preferiblemente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4 ó 3 nucleótidos de un extremo 5' y/o 3'-terminal, lo más preferiblemente dentro de 6, 5, 4 ó 3 nucleótidos del extremo 5'-terminal de la hebra sentido o el extremo 3'-terminal de la hebra antisentido. La hebra sentido sólo es necesario que sea lo suficientemente complementaria con la hebra antisentido como para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

Se prefiere que las hebras sentido y antisentido se elijan de manera que el agente de ARNi incluya una única hebra o región desapareada en uno o ambos extremos de la molécula. Por tanto, un agente de ARNi contiene hebras sentido y antisentido, preferiblemente apareadas para contener una proyección, por ejemplo, una o dos proyecciones en 5' o 3' pero preferiblemente una proyección en 3' de 2-3 nucleótidos. La mayor parte de las realizaciones tendrán una proyección en 3'. Los agentes de ARNic preferidos tendrán proyecciones monocatenarias, preferiblemente proyecciones en 3', de 1 a 4, o preferiblemente 2 ó 3 nucleótidos, de longitud, en uno o ambos extremos del agente de ARNi. Las proyecciones pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que están escalonadas. Los nucleótidos desapareados que forman la proyección pueden ser ribonucleótidos, o pueden ser desoxirribonucleótidos, preferiblemente timidina. Los extremos 5' se fosforilan preferiblemente, o pueden estar sin fosforilar.

Longitudes preferidas para la región de dúplex tienen entre 15 y 30, lo más preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22 y 23 nucleótidos de longitud, por ejemplo, en el intervalo de agente de ARNic analizado anteriormente. Los agentes de ARNic pueden asemejarse en longitud y estructura a los productos procesados por Dicer naturales de ARNbc largos. También están incluidas realizaciones en las que las dos hebras del agente de ARNic se unen, por ejemplo, se unen covalentemente. Las estructuras de horquilla, u otras monocatenarias que proporcionan la región bicatenaria requerida, y preferiblemente una proyección en 3' también están dentro de la descripción.

Evaluación de agentes de ARNi candidatos

Tal como se indicó anteriormente, la presente descripción proporciona un sistema para identificar ARNic que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Puesto que, tal como se indicó anteriormente, los ARNh_c se procesan de manera intracelular para producir ARNic que tienen partes de dúplex con la misma secuencia que la estructura de tallo de los ARNh_c, el sistema es igualmente útil para identificar ARNh_c que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Para los fines de descripción, esta sección se referirá a ARNic, pero el sistema también engloba los correspondientes ARNh_c. Específicamente, la presente descripción demuestra la preparación satisfactoria de ARNic dirigidos para inhibir la actividad de alfa-ENaC. Las técnicas y los reactivos descritos en el presente documento pueden aplicarse fácilmente para diseñar posibles nuevos ARNic, dirigidos a otros genes o regiones de genes, y sometidos a prueba para determinar su actividad en la inhibición de alfa-ENaC tal como se analiza en el presente documento.

En diversas realizaciones, pueden someterse a prueba posibles inhibidores de alfa-ENaC para determinar la supresión de la expresión endógena de alfa-ENaC introduciendo ARNic candidato(s) en células (por ejemplo, mediante la administración exógena o mediante la introducción de un vector o constructo que dirige la síntesis endógena de ARNic en la célula), o en animales de laboratorio mediante administración pulmonar o nasal. Alternativamente, pueden someterse a prueba posibles inhibidores de alfa-ENaC *in vitro* mediante la cotransfección transitoria de ARNic candidato(s) junto con un plásmido de expresión de alfa-ENaC. Se evalúa entonces la capacidad del/de los ARNic candidato(s) para reducir niveles de transcritos diana y/o para inhibir o suprimir uno o más aspectos o características de la actividad de alfa-ENaC tales como diferencia de potencial epitelial o absorción de fluido de superficie de las vías respiratorias.

Pueden compararse células o animales de laboratorio a los que se han suministrado composiciones de ARNic de la invención (células/animales de prueba) con células o animales de laboratorio similares o comparables que no han recibido la composición de la invención (células/animales control, por ejemplo, células/animales que no han recibido ni ARNic ni un ARNic control tal como un ARNic dirigido a un transcrito no endógeno tal como proteína fluorescente verde (GFP)). El fenotipo de transporte de iones de las células/animales de prueba puede compararse con el fenotipo de células/animales control, siempre que el ARNic de la invención comparta reactividad cruzada de

secuencia con la especie/tipo de célula de prueba. La producción de proteína alfa-ENaC y corriente de cortocircuito (*in vitro* o *ex vivo*) puede compararse en las células/animales de prueba con relación a las células/animales control. De manera similar, pueden compararse otros indicios de la actividad de alfa-ENaC, incluyendo diferencia de potencial epitelial *ex vivo* o aclaramiento mucociliar *in vivo* o obtención de imágenes mediante resonancia magnética (IRM) de cuerpo entero. Generalmente, las células/animales de prueba y células/animales control procederán de la misma especie y, para células, de tipo de célula similar o idéntico. Por ejemplo, podrían compararse células de la misma línea celular. Cuando la célula de prueba sea una célula primaria, normalmente la célula control también sería una célula primaria.

Por ejemplo, la capacidad de un ARNi candidato para inhibir la actividad de alfa-ENaC puede determinarse convenientemente (i) suministrando el ARNi candidato a células (ii) evaluando los niveles de expresión de ARNm de alfa-ENaC con relación a un gen de control expresado de manera endógena (iii) comparando la corriente sensible a amilorida en un modelo celular *in vitro* producido en presencia del ARNi con la cantidad producida en ausencia del ARNi. Este último ensayo puede usarse para someter a prueba ARNi que seleccionan como diana cualquier transcrito diana que puede influir en la actividad de alfa-ENaC indirectamente y no se limita a ARNi que seleccionan como diana los transcritos que codifican para las subunidades del canal ENaC.

La capacidad de un ARNi candidato para reducir el nivel del transcrito diana puede evaluarse midiendo la cantidad del transcrito diana usando, por ejemplo, transferencias de tipo Northern, ensayos de protección de nucleasas, hibridación con sondas, transcripción inversa (RT)-PCR, RT-PCR en tiempo real, análisis de microalineamientos, etc. La capacidad de un ARNi candidato para inhibir la producción de un polipéptido codificado por el transcrito diana (o bien a nivel transcripcional o bien postranscripcional) puede medirse usando una variedad de enfoques basados en anticuerpos incluyendo, pero sin limitarse a, inmunotransferencias de tipo Western, inmunoensayos, ELISA, citometría de flujo, microalineamientos de proteínas, etc. En general, puede usarse cualquier método de medición de la cantidad de o bien el transcrito diana o bien un polipéptido codificado por el transcrito diana.

En general, determinados inhibidores de ARNi de alfa-ENaC preferidos reducen el nivel de transcrito diana al menos aproximadamente 2 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 16 veces, al menos aproximadamente 64 veces o en un grado incluso mayor con relación al nivel que estaría presente en ausencia del inhibidor (por ejemplo, en una célula control comparable que carece del inhibidor). En general, determinados inhibidores de ARNi de alfa-ENaC preferidos inhiben la actividad del canal ENaC, de modo que la actividad es menor en una célula que contiene el inhibidor que en una célula control que no contiene el inhibidor en al menos aproximadamente 2 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 16 veces, al menos aproximadamente 64 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o en un grado incluso mayor.

Determinados inhibidores de ARNi de alfa-ENaC preferidos inhiben la actividad del canal ENaC durante al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 120 horas, al menos 144 horas o al menos 168 horas tras la administración del ARNi y la infección de las células. Determinados inhibidores de alfa-ENaC preferidos impiden (es decir, reducen hasta niveles indetectables) o reducen significativamente la actividad de alfa-ENaC durante al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas o al menos 60 horas tras la administración del ARNi. Según diversas realizaciones, una reducción significativa en la actividad de alfa-ENaC es una reducción hasta menos de aproximadamente el 90% del nivel que se produciría en ausencia del ARNi, una reducción hasta menos de aproximadamente el 75% del nivel que se produciría en ausencia del ARNi, una reducción hasta menos de aproximadamente el 50% del nivel que se produciría en ausencia del ARNi, una reducción hasta menos de aproximadamente el 25% del nivel que se produciría en ausencia del ARNi o una reducción hasta menos de aproximadamente el 10% del nivel que se produciría en ausencia del ARNi. La reducción en la actividad de alfa-ENaC puede medirse usando cualquier método adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, medición de la corriente de cortocircuito de la sensibilidad a amilorida *in vitro*, diferencia de potencial epitelial *ex vivo* o aclaramiento mucociliar *in vivo* o IRM de cuerpo entero/pulmonar.

Pruebas de estabilidad, modificación y nuevas pruebas de agentes de ARNi

Un agente de ARNi candidato puede evaluarse con respecto a la estabilidad, por ejemplo, su susceptibilidad a la escisión por una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando el agente de ARNi se introduce en el cuerpo de un sujeto. Pueden emplearse métodos para identificar sitios que son susceptibles de modificación, particularmente escisión, por ejemplo, escisión por un componente que se encuentra en el cuerpo de un sujeto. Tales métodos pueden incluir el aislamiento y la identificación de los fragmentos más abundantes formados por la degradación del agente de ARNi candidato tras su incubación con medios biológicos aislados *in vitro*, por ejemplo suero, plasma, esputo, líquido cefalorraquídeo o homogeneizados celulares o tisulares, o tras poner en contacto un sujeto con el agente de ARNi candidato *in vivo*, identificando de ese modo sitios propensos a la escisión. Tales métodos están, por ejemplo, sin limitación, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2005115481, presentada el 27 de mayo de 2005.

5 Cuando se identifican sitios susceptibles a la escisión, puede diseñarse y/o sintetizarse un agente de ARNi adicional en el que el posible sitio de escisión se hace resistente a la escisión, por ejemplo mediante la introducción de una modificación en 2' en el sitio de escisión, por ejemplo un grupo 2'-O-metilo. Este agente de ARNi adicional puede volverse a someter a prueba para determinar la estabilidad, y puede iterarse este proceso hasta que se encuentre un agente de ARNi que presente la estabilidad deseada.

Pruebas *in vivo*

10 Puede someterse a prueba un agente de ARNi identificado como que puede inhibir la expresión génica de alfa-ENaC para determinar la funcionalidad *in vivo* en un modelo animal (por ejemplo, en un mamífero, tal como en ratón, rata, cobaya o primate). Por ejemplo, el agente de ARNi puede administrarse a un animal, y el agente de ARNi evaluarse con respecto a su biodistribución, estabilidad y su capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC o modular un proceso biológico o patológico mediado al menos en parte por alfa-ENaC.

15 El agente de ARNi puede administrarse directamente al tejido diana, tal como mediante inyección, o el agente de ARNi puede administrarse al modelo animal de la misma manera que se administraría a un ser humano. Preferiblemente, el agente de ARNi se suministra a las vías respiratorias del sujeto, tal como mediante administración intranasal, inhalada o intratraqueal.

20 El agente de ARNi también puede evaluarse por su distribución intracelular. La evaluación puede incluir determinar si el agente de ARNi se captó en la célula. La evaluación también puede incluir determinar la estabilidad (por ejemplo, la semivida) del agente de ARNi. La evaluación de un agente de ARNi *in vivo* puede facilitarse mediante el uso de un agente de ARNi conjugado con un marcador rastreable (por ejemplo, un marcador fluorescente tal como fluoresceína; un marcador radiactivo, tal como ³⁵S, ³²P, ³³P o ³H; partículas de oro; o partículas de antígeno para inmunohistoquímica).

25 El agente de ARNi puede evaluarse con respecto a su capacidad para regular por disminución la expresión de alfa-ENaC. Pueden medirse los niveles de expresión génica de alfa-ENaC *in vivo*, por ejemplo, mediante hibridación *in situ*, o mediante el aislamiento de ARN de tejido antes de y tras la exposición al agente de ARNi. Cuando es necesario sacrificar al animal para recoger el tejido, un animal control no tratado servirá para la comparación. Puede detectarse ARN de alfa-ENaC mediante cualquier método deseado, incluyendo pero sin limitarse a RT-PCR, transferencia de tipo Northern, ensayo de ADN ramificado o ensayo de protección de ARNasa. Alternativa o adicionalmente, puede monitorizarse la expresión génica de alfa-ENaC mediante la realización de análisis de in inmunotransferencia de tipo Western o inmunotinción con extractos de tejido tratados con el agente de ARNi.

30 Pueden someterse a prueba posibles inhibidores de alfa-ENaC usando cualquier variedad de modelos animales que se han desarrollado. Pueden administrarse composiciones que comprenden ARNi candidato(s), constructos o vectores que pueden dirigir la síntesis de tales ARNi dentro de una célula huésped, o células modificadas mediante ingeniería o manipuladas para contener ARNi candidatos, a un animal. Se evalúa la capacidad de la composición para suprimir la expresión de alfa-ENaC y/o para modificar fenotipos dependientes de ENaC y/o reducir su intensidad con relación a animales que no han recibido el posible inhibidor de alfa-ENaC. Tales modelos incluyen, pero no se limitan a, modelos murinos, de ratas, cobayas y primates no humanos para fenotipos dependientes de ENaC, todos los cuales se conocen en la técnica y se usan para someter a prueba la eficacia de posibles agentes terapéuticos de alfa-ENaC.

40 Utilizando los sistemas inventados para identificar agentes de ARNi terapéuticos candidatos, se seleccionan agentes terapéuticos adecuados de los identificadores de dúplex ND-8302, ND-8332, ND-8348, ND-8356, ND-8357, ND-8373, ND-8381, ND-8396, ND-8450 y ND-8453, seleccionados de manera más adecuada de ND-8356, ND-8357 y ND-8396.

Química de ARNi

45 Se describen en el presente documento agentes de ARNi aislados, por ejemplo, agentes de ARN bc que median iARN para inhibir la expresión del gen de alfa-ENaC.

50 Los agentes de ARN analizados en el presente documento incluyen ARN no modificado de otro modo así como ARN que se ha modificado, por ejemplo, para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósido. ARN no modificado se refiere a una molécula en la que los componentes del ácido nucleico, concretamente azúcares, bases, y restos fosfato, son los mismos o esencialmente los mismos tal como se producen en la naturaleza, preferiblemente tal como se producen de manera natural en el cuerpo humano. La técnica se ha referido a ARN raros o poco comunes, pero que se producen de manera natural, como ARN modificados, véase, por ejemplo, Limbach *et al.* Nucleic Acids Res. 22: 2183-2196, 1994. Tales ARN raros o poco comunes, a menudo denominados ARN modificados (aparentemente porque son normalmente el resultado de una modificación postranscripcional) están dentro de la expresión ARN no modificado, tal como se usa en el presente documento. ARN modificado tal como se

usa se refiere en el presente documento a una molécula en la que uno o más de los componentes del ácido nucleico, concretamente azúcares, bases y restos fosfato, son diferentes de los que se producen en la naturaleza, preferiblemente diferentes de los que se producen en el cuerpo humano. Aunque se denominan "ARN" modificados", naturalmente incluirán de hecho, debido a la modificación, moléculas que no son ARN. Los sustitutos de nucleósido son moléculas en las que la estructura principal de ribofosfato se reemplaza por un constructo distinto a ribofosfato que permite que se presenten las bases en la relación espacial correcta de manera que la hibridación es sustancialmente similar a la que se observa con una estructura principal de ribofosfato, por ejemplo, miméticos no cargados de la estructura principal de ribofosfato. Se analizan ejemplos de los anteriores en el presente documento.

Pueden incorporarse las modificaciones descritas en el presente documento en cualquier ARN bicatenario y molécula de tipo ARN descritos en el presente documento, por ejemplo, un agente de ARNi. Puede ser deseable modificar una o ambas de las hebras antisentido y sentido de un agente de ARNi. Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas a continuación se producen en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base o un resto fosfato, o el oxígeno que no se une de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones objeto en el ácido nucleico pero en muchos, casos y de hecho en la mayoría, no lo hará. A modo de ejemplo, puede producirse una modificación sólo en una posición 3' o 5' terminal, puede producirse sólo en una región terminal, por ejemplo en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 ó 10 nucleótidos de a hebra. Puede producirse una modificación en una región bicatenaria, una región monocatenaria, o en ambas. Por ejemplo, puede producirse una modificación de fosforotioato en una posición de O que no se une, sólo en uno o ambos extremos terminales, puede producirse sólo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 ó 10 nucleótidos de una hebra, o puede producirse en regiones bicatenarias y monocatenarias, particularmente en los extremos terminales. De manera similar, puede producirse una modificación en la hebra sentido, la hebra antisentido, o ambas. En algunos casos, la hebra sentido y antisentido tendrán las mismas modificaciones o la misma clase de modificaciones, pero en otros casos la hebra sentido y antisentido tendrán diferentes modificaciones, por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable modificar sólo una hebra, por ejemplo la hebra sentido.

Dos objetivos principales para la introducción de modificaciones en agentes de ARNi es su estabilización frente a la degradación en entornos biológicos y la mejora de propiedades farmacológicas, por ejemplo propiedades farmacodinámicas, que se analizan adicionalmente a continuación. Se describen otras modificaciones adecuadas a un azúcar, una base o estructura principal de un agente de ARNi en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/01193, presentada el 16 de enero de 2004. Un agente de ARNi puede incluir una base que no se produce de manera natural, tal como las bases descritas en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/011822, presentada el 16 de abril de 2004. Un agente de ARNi puede incluir un azúcar que no se produce de manera natural, tal como una molécula portadora cíclica distinta a hidrato de carbono. Se describen características a modo de ejemplo de azúcares que no se producen de manera natural para su uso en agentes de ARNi en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/11829, presentada el 16 de abril de 2003.

Un agente de ARNi puede incluir una unión internucleotídica (por ejemplo, la unión fosforotioato quiral) útil para aumentar la resistencia a nucleasas. Además, o como alternativa, un agente de ARNi puede incluir un mimético de ribosa para una resistencia a nucleasas aumentada. Se describen uniones internucleotídicas y miméticos de ribosa para una resistencia a nucleasas aumentada a modo de ejemplo en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Un agente de ARNi puede incluir monómeros y subunidades monoméricas conjugados con ligandos para la síntesis de oligonucleótidos. Se describen monómeros a modo de ejemplo en la solicitud estadounidense n.º 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004.

Un agente de ARNi puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Un agente de ARNi puede complejarse con un resto anfipático. Se describen restos anfipáticos a modo de ejemplo para su uso con agentes de ARNi en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

En otra realización, el agente de ARNi puede complejarse con un agente de administración que presenta un complejo modular. El complejo puede incluir un agente portador unido a uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente los tres de): (a) un agente de condensación (por ejemplo, un agente que puede atraer, por ejemplo, unir, un ácido nucleico, por ejemplo, a través de interacciones iónicas o electrostáticas); (b) un agente fusogénico (por ejemplo, un agente que puede fusionarse y/o transportarse a través de una membrana celular); y (c) un grupo de direccionamiento, por ejemplo, un agente de direccionamiento celular o tisular, por ejemplo, una lectina, una glicoproteína, un lípido o una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico. Se describen agentes de ARNi complejados con un agente de administración en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Un agente de ARNi puede tener apareamientos no canónicos, tales como entre las secuencias sentido y antisentido del dúplex de ARNi. Se describen características a modo de ejemplo de agentes de ARNi no canónicos en la solicitud PCT n.º PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Resistencia a nucleasas potenciada

- 5 Un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi que selecciona como diana alfa-ENaC, puede tener resistencia a nucleasas potenciada.

Una manera de aumentar la resistencia es identificar sitios de escisión y modificar tales sitios para inhibir la escisión, tal como se describe en la solicitud estadounidense n.º 60/559.917, presentada el 4 de mayo de 2004. Por ejemplo, los dinucleótidos de 5'-ua-3', 5'-ca-3', 5'-ug-3', 5'-uu-3' ó 5'-cc-3' pueden servir como sitios de escisión. En determinadas realizaciones, todas las pirimidinas de un agente de ARNi portan una modificación en 2' en o bien la hebra sentido, la hebra antisentido, o bien ambas hebras, y el agente de ARNi tiene por tanto resistencia a endonucleasas potenciada. También puede lograrse una resistencia a nucleasas potenciada mediante la modificación del nucleótido en 5', lo que da como resultado, por ejemplo, al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3') en el que la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido de 5'-citidina-citidina-3' (5'-cc-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', tal como se describe en la solicitud internacional n.º PCT/US2005/018931, presentada el 27 de mayo de 2005. El agente de ARNi puede incluir al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 de tales dinucleótidos. En una realización particularmente preferida, el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencia 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en o bien la hebra sentido, la hebra antisentido, o bien ambas hebras es un nucleótido modificado. Preferiblemente, el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencia 5'-ua-3', 5'-ca-3' y 5'-ug-3' en o bien la hebra sentido, la hebra antisentido, o bien ambas hebras es un nucleótido modificado. Más preferiblemente, todos los nucleótidos de pirimidina en la hebra sentido son nucleótidos modificados, y el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencia 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en la hebra antisentido son nucleótidos modificados, o cuando la hebra antisentido no comprende ninguno de un motivo 5'-ua-3' y uno 5'-ca-3', en todas las apariciones del motivo de secuencia 5'-ug-3'.

Preferiblemente, los nucleótidos modificados en 2' incluyen, por ejemplo, una unidad de ribosa modificada en 2', por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo (OH) pueden modificarse o reemplazarse por varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes.

Los ejemplos de modificaciones "oxi" de grupo 2'-hidroxilo incluyen alcoxilo o ariloxilo (OR, por ejemplo, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el 2' hidroxilo se conecta, por ejemplo, mediante un puente de metileno, al carbono en 4' del mismo azúcar de ribosa; O-amina y aminoalcoxilo, $O(CH_2)_n$ -amina, (por ejemplo, amina = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicil-amino, arilamino, diaril-amino, heteroaril-amino, o diheteroaril-amino, etilendiamina, poliamino). Cabe destacar que los oligonucleótidos que contienen sólo el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado de PEG, presentan estabilidades para nucleasas comparables a los modificados con la robusta modificación de fosforotioato.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir, azúcares de desoxirribosa, que son de particular relevancia para las partes de proyección de ARN parcialmente bc); halo (por ejemplo, fluoro); amino (por ejemplo, NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicilo, arilamino, diaril-amino, heteroaril-amino, diheteroaril-amino, o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -AMINA (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclicil-amino, arilamino, diaril-amino, heteroaril-amino o diheteroaril-amino), -NHC(O)R (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxilo; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquino, que pueden estar opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, una funcionalidad amino.

Sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-fluoro.

La inclusión de azúcares de furanosa en la estructura principal de oligonucleótido también puede disminuir la escisión endonucleolítica. Un agente de ARNi puede modificarse adicionalmente incluyendo un grupo catiónico en 3', o invirtiendo el nucleósido en el extremo 3'-terminal por una unión 3'-3'. En otra alternativa, el extremo 3'-terminal puede bloquearse con un grupo aminoalquilo, por ejemplo, un 3'-C5-aminoalquil-dT. Otros conjugados en 3' pueden presentar escisión endonucleolítica en 3'-5'. Aunque sin limitarse por la teoría, un conjugado en 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando estéricamente que la exonucleasa se una al extremo 3' del oligonucleótido. Incluso pequeñas cadenas de alquilo, grupos arilo o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear 3'-5'-exonucleasas.

También puede inhibirse la escisión nucleolítica mediante la introducción de modificaciones de grupo de unión de fosfato, por ejemplo, uniones fosforotioato. Por tanto, los agentes de ARNi preferidos incluyen dímeros de nucleótidos enriquecidos o puros para una forma quiral particular de un grupo fosfato modificado que contiene un heteroátomo en la posición que no forma puentes ocupada normalmente por oxígeno. El heteroátomo puede ser S, Se, Nr_2 o Br_3 . Cuando el heteroátomo es S, se prefiere la unión Sp enriquecida o quiralmente pura. Enriquecido significa al menos el 70, 80, 90, 95 o el 99% de la forma preferida. Las uniones fosfato modificadas son particularmente eficaces en la inhibición de la escisión exonucleolítica cuando se introducen cerca de las posiciones 5' o 3'-terminales, y preferiblemente las posiciones 5'-terminales, de un agente de ARNi.

Los conjugados en 5' también pueden inhibir la escisión exonucleolítica en 5'-3'. Aunque sin limitarse por la teoría, un conjugado en 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando estéricamente que la exonucleasa se una al extremo 5' del oligonucleótido. Incluso pequeñas cadenas de alquilo, grupos arilo o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear 3'-5'-exonucleasas.

Un agente de ARNi puede tener una resistencia a nucleasas aumentada cuando un agente de ARNi dúplex incluye una proyección monocatenaria de nucleótidos en al menos un extremo. En realizaciones preferidas, la proyección de nucleótidos incluye de 1 a 4, preferiblemente de 2 a 3, nucleótidos desapareados. En una realización preferida, el nucleótido desapareado de la proyección monocatenaria que está directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base purínica, y el par de nucleótidos terminal es un par G-C, o al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares G-C. En realizaciones adicionales, la proyección de nucleótidos puede tener 1 ó 2 nucleótidos desapareados, y en una realización a modo de ejemplo, la proyección de nucleótidos es 5'-gc-3'. En realizaciones preferidas, la proyección de nucleótidos está en el extremo 3' de la hebra antisentido. En una realización, el agente de ARNi incluye el motivo 5'-cgc-3' en el extremo 3' de la hebra antisentido, de manera que se forma una proyección de 2 nt 5'-gc-3'.

Por tanto, un agente de ARNi puede incluir modificaciones de modo que se inhiba la degradación, por ejemplo, mediante nucleasas, por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas, que se encuentran en el cuerpo de un sujeto. Estos monómeros se denominan en el presente documento NRM, o monómeros que promueven la resistencia a nucleasas, las modificaciones correspondientes, modificaciones de NRM. En muchos casos, estas modificaciones modularán también otras propiedades del agente de ARNi, por ejemplo, la capacidad para interactuar con una proteína, por ejemplo, una proteína de transporte, por ejemplo, albúmina sérica, o un miembro del RISC, o la capacidad de las secuencias primera y segunda para formar un dúplex entre sí o para formar a dúplex con otra secuencia, por ejemplo, una molécula diana.

Pueden introducirse una o más modificaciones de NRM diferentes en un agente de ARNi o en una secuencia de un agente de ARNi. Puede usarse una modificación de NRM más de una vez en una secuencia o en un agente de ARNi.

Las modificaciones de NRM incluyen algunas que pueden situarse sólo en el extremo terminal y otras que pueden ir en cualquier posición. Algunas modificaciones de NRM pueden inhibir la hibridación de modo que es preferible usarlas sólo en regiones terminales, y es preferible no usarlas en el sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia que selecciona como diana una secuencia o gen objeto, particularmente en la hebra antisentido. Pueden usarse en cualquier lugar en una hebra sentido, siempre que se mantenga una suficiente hibridación entre las dos hebras del agente de ARNi bc. En algunas realizaciones, es deseable poner el NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión de una hebra sentido, ya que puede minimizar el silenciamiento inespecífico.

En la mayoría de los casos, las modificaciones de NRM se distribuirán de diferente manera dependiendo de si se componen de una hebra sentido o antisentido. Si son en una hebra antisentido, no deben insertarse modificaciones que interfieran en o inhiban la escisión por endonucleasas, en la región que está sometida a escisión mediada por RISC, por ejemplo, el sitio de escisión o la región de escisión (tal como se describe en Elbashir *et al.*, 2001, Genes and Dev. 15: 188, incorporado al presente documento como referencia). La escisión de la diana se produce aproximadamente en la mitad de una hebra antisentido de 20 ó 21 nt, o aproximadamente a 10 u 11 nucleótidos en el sentido de 5' con respecto al primer nucleótido en el ARNm diana que es complementario a la hebra antisentido. Tal como se usa en el presente documento, sitio de escisión se refiere a los nucleótidos en cualquier lado del sitio de escisión, en la diana o en la hebra del agente de ARNi que se hibrida como el mismo. Región de escisión significa los nucleótidos dentro de 1, 2 ó 3 nucleótidos del sitio de escisión, en cualquier sentido.

Pueden introducirse tales modificaciones en las regiones terminales, por ejemplo, en la posición terminal o con 2, 3, 4 ó 5 posiciones del extremo terminal, de una hebra sentido o antisentido.

Ligandos fijados

Las propiedades de un agente de ARNi, incluyendo sus propiedades farmacológicas, pueden influenciarse y

adaptarse a medida, por ejemplo, mediante la introducción de ligandos, por ejemplo ligandos fijados. Además, las propiedades farmacológicas de un agente de ARNi pueden mejorarse incorporando un ligando en una formulación del agente de ARNi cuando el agente de ARNi o bien tiene o bien no tiene un ligando fijado.

5 Una amplia variedad de entidades, por ejemplo, ligandos, pueden fijarse a un agente de ARNi o usarse como aditivo o conjugado de formulación, por ejemplo, al portador de una subunidad monomérica conjugada con ligando. Se describen ejemplos a continuación en el contexto de una subunidad monomérica conjugada con ligando pero que sólo se prefiere, de entidades que pueden acoplarse en otros puntos a un agente de ARNi.

10 Restos preferidos son ligandos, que se acoplan, preferiblemente de manera covalente, o bien directa o bien indirectamente, a través de una fijación intermedia al portador. En realizaciones preferidas, el ligando se une al portador a través de una fijación intermedia. El ligando o ligando fijado puede estar presente en el monómero conjugado con ligando cuando el monómero conjugado con ligando se incorpora en la hebra en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse en una subunidad monomérica conjugada con ligando "precursora" tras haberse incorporado una subunidad monomérica conjugada con ligando "precursora" en la hebra en crecimiento. Por ejemplo, puede incorporarse un monómero que tiene, por ejemplo, una fijación terminada en amino, por ejemplo, TAP-(CH₂)_nNH₂ en una hebra sentido o antisentido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, tras la incorporación de la subunidad monomérica precursora en la hebra, puede unirse posteriormente un ligando que tiene un grupo electrófilo, por ejemplo, un éster pentafluorofenílico o grupo aldehído, al monómero conjugado con ligando precursor mediante acoplamiento del grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal de la fijación de subunidad monomérica conjugada con ligando precursora.

20 En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, el direccionamiento o la vida de un agente de ARNi en el que se incorpora. En realizaciones preferidas, un ligando proporciona una afinidad potenciada por una diana seleccionada, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, por ejemplo, un compartimento celular u orgánico, tejido, órgano o región del cuerpo, en comparación, por ejemplo, con una especie en que está ausente tal ligando.

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

30 Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, por ejemplo, para potenciar la captación; compuestos de diagnóstico o grupos indicadores por ejemplo, para monitorizar la distribución; agentes de reticulación; restos que confieren resistencia a nucleasas; y bases nitrogenadas naturales o poco comunes. Los ejemplos generales incluyen moléculas lipófilas, lípidos, lectinas, esteroides (por ejemplo, uvaol, hecogenina, diosgenina), terpenos (por ejemplo, triterpenos, por ejemplo, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado con epifriedelanol), vitaminas, hidratos de carbono (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, polímeros sintéticos (por ejemplo, pentadecámero de oligo-lactato) y naturales (por ejemplo, de peso molecular bajo y medio), inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, agentes de unión a proteína, moléculas de selección como diana de integrina, moléculas policationicas, péptidos, poliaminas y peptidomiméticos. Otros ejemplos incluyen ácido fólico o ligandos de receptores de células epiteliales, tales como transferina.

40 El ligando puede ser una molécula que se produce de manera natural o recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, restos catiónicos, por ejemplo, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido α -helicoidal.

50 Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, por ejemplo, un agente de direccionamiento celular o tisular, por ejemplo, una tiotropina, melanotropina, proteína de surfactante A, hidrato de carbono de mucina, un poliaminoácido glicosilado, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato o un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) o peptidomimético de RGD.

55 Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, lipoproteínas, por ejemplo lipoproteínas de baja densidad (LDL), o albúminas, por ejemplo albúmina sérica humana (HSA), o péptidos, por ejemplo, moléculas que tengan una afinidad específica por un coligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un tipo de célula especificado tal como una célula cancerosa, célula endotelial o célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores hormonales. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como cofactores,

lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente o fucosa multivalente.

5 El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo un fármaco, que puede aumentar la captación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, perturbando el citoesqueleto celular, por ejemplo, perturbando los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxol, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jasplakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, mioservina, tetraciclina.

10 En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula basada en lípido. Una molécula lipídica o basada en lípido de este tipo se une preferiblemente a una proteína del suero, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, por ejemplo, tejido hepático, incluyendo las células parenquimatosas del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA también pueden utilizarse como ligandos. Por ejemplo, pueden usarse naproxeno o aspirina. Un ligando lipídico o basado en lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte a una célula o membrana celular diana, y/o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína del suero, por ejemplo, HSA.

Puede utilizarse un ligando basado en lípido para modular, por ejemplo controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un ligando lipídico o basado en lípido que se une a HSA más fuertemente tendrá menor probabilidad de direccionarse al riñón y por consiguiente tendrá menor probabilidad de aclararse del cuerpo.

20 En una realización preferida, el ligando de base lipídica puede unirse a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con afinidad suficiente de manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente en un tejido distinto del riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión HSA-ligando no pueda revertirse.

25 En otro aspecto, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina o nutriente, que se capta por una célula diana, por ejemplo, una célula en proliferación. Éstos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación indeseable de células, por ejemplo, del tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Las vitaminas a modo de ejemplo incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas a modo de ejemplo incluyen las vitaminas B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por las células cancerosas.

30 En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente a modo de ejemplo es un péptido tal como tat o antenapedia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, incluyendo un mimético peptídico, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y una fase lipófoba. El agente de permeación celular puede unirse covalentemente al agente de ARNi o ser parte de un complejo de ARNi-péptido.

Modificaciones de 5'-fosfato

35 En realizaciones preferidas, los agentes de ARNi están fosforilados en 5' o incluyen un análogo de fosforilo en el extremo terminal 5' principal. Las modificaciones de 5'-fosfato de la hebra antisentido incluyen aquéllas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-OP(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); caperuza de 5'-guanosina (metilada en 7 o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); caperuza de 5'-adenosina (Appp), y cualquier estructura de caperuza de nucleótidos modificada o no modificada (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato y trifosfatos con oxígeno/azufre reemplazados (por ejemplo, 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquileterfosfonatos (R = alquil éter = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5'-).

50 La hebra sentido puede modificarse con el fin de desactivar la hebra sentido e impedir la formación de un RISC activo, reduciendo potencialmente de este modo los efectos inespecíficos. Esto puede lograrse mediante una modificación que impide la fosforilación en 5' de la cadena sentido, por ejemplo mediante la modificación con un 5'-O-metil-ribonucleótido (véase Nykänen *et al.*, (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, Cell 107, 309-321). Pueden usarse también otras modificaciones que impiden la fosforilación, por ejemplo sustituyendo simplemente el 5'-OH por H en lugar de O-Me. Alternativamente, puede añadirse un grupo voluminoso grande al 5'-fosfato convirtiéndolo en un enlace fosfodiéster.

Bases nitrogenadas no naturales

Nitropirrolilo y nitroindolilo son bases nitrogenadas no naturales que son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquellos compuestos que pueden reemplazar cualquiera de las cuatro bases que se producen de manera natural sin afectar sustancialmente al comportamiento de fusión o la actividad del dúplex de oligonucleótido. A diferencia de las interacciones de enlaces de hidrógeno de estabilización asociadas con las bases nitrogenadas que se producen de manera natural, se postula que los dúplex de oligonucleótido que contienen bases nitrogenadas de 3-nitropirrolilo se estabilizan únicamente mediante el apilado de interacciones. La ausencia de interacciones de enlaces de hidrógeno significativas con bases nitrogenadas de nitropirrolilo obvia la especificidad por una base complementaria específica. Además, diversos informes confirman que 4, 5 y 6-nitroindolilo presentan muy poca especificidad por las cuatro bases naturales. De manera interesante, un dúplex de oligonucleótido que contiene 5-nitroindolilo era más estable que los correspondientes oligonucleótidos que contienen 4-nitroindolilo y 6-nitroindolilo. Se describen procedimientos para la preparación de 1-(2'-O-metil-β-D-ribofuranosil)-5-nitroindol en Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629. Otras bases universales incluyen hipoxantilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobenzimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, y derivados estructurales de los mismos. Para un análisis más detallado, que incluye procedimientos de síntesis, de nitropirrolilo, nitroindolilo, y otras bases universales mencionadas anteriormente véanse Vallone *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 27(17):3589-3596 (1999); Loakes *et al.*, *J. Mol. Bio.*, 270:426-436 (1997); Loakes *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 22(20):4039-4043 (1994); Oliver *et al.*, *Organic Letters*, Vol. 3(13):1977-1980 (2001); Amosova *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 25(10):1930-1934 (1997); Loakes *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 29(12):2437-2447 (2001); Bergstrom *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117:1201-1209 (1995); Franchetti *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 11:67-69 (2001); y Nair *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 20(4-7):735-738 (2001).

El difluorotolilo es una base nitrogenada no natural que funciona como base universal. El difluorotolilo es un isómero de la base nitrogenada natural timina. Pero a diferencia de timina, el difluorotolilo no muestra selectividad apreciable por ninguna de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funcionan como bases universales y que son aptos para la presente descripción son 4-fluoro-6-metilbencimidazol y 4-metilbencimidazol. Además, los derivados de isocarbostirililo relativamente hidrófobos 3-metil-isocarbostirililo, 5-metil-isocarbostirililo y 3-metil-7-propinil-isocarbostirililo son bases universales que producen sólo una ligera desestabilización de dúplex de oligonucleótido en comparación con la secuencia de oligonucleótido que contiene sólo bases naturales. Otras bases nitrogenadas no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidazopiridinilo, 9-metil-imidazopiridinilo, pirrolopirazinilo, isocarbostirililo, 7-propinil-isocarbostirililo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenantraceno, pirenilo, estilbenilo, tetraceno, pentaceno, y derivados estructurales de los mismos. Para un análisis más detallado, que incluye procedimientos de síntesis, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, véanse: Schweitzer *et al.*, *J. Org. Chem.*, 59:7238-7242 (1994); Berger *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 28(15):2911-2914 (2000); Moran *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 119:2056-2057 (1997); Morales *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:2323-2324 (1999); Guckian *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8182-8183 (1996); Morales *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 122(6):1001-1007 (2000); McMinn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-11586 (1999); Guckian *et al.*, *J. Org. Chem.*, 63:9652-9656 (1998); Moran *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:10506-10511 (1997); Das *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1:197-206 (2002); Shibata *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1:1605-1611 (2001); Wu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 122(32):7621-7632 (2000); O'Neill *et al.*, *J. Org. Chem.*, 67:5869-5875 (2002); Chaudhuri *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117:10434-10442 (1995); y la patente estadounidense n.º 6.218.108.

Transporte de agentes de ARNi a células

Sin desear limitarse mediante ninguna teoría, la similitud química entre agentes de ARNi conjugados con colesterol y determinados constituyentes de las lipoproteínas (por ejemplo, colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos) puede conducir a la asociación de agentes de ARNi con lipoproteínas (por ejemplo, LDL, HDL) en sangre y/o la interacción del agente de ARNi con componentes celulares que tienen una afinidad por colesterol, por ejemplo componentes de la ruta de transporte de colesterol. Las lipoproteínas así como sus constituyentes se captan y procesan por células mediante diversos mecanismos de transporte activos y pasivos, por ejemplo, sin limitación, endocitosis de LDL unida al receptor de LDL, endocitosis de LDL oxidadas o modificadas de otro modo a través de la interacción con el receptor depurador A, la captación mediada por el receptor depurador B1 de HDL-colesterol en el hígado, pinocitosis, o transporte de colesterol a través de membranas mediante proteínas transportadoras de tipo ABC (casete de unión a ATP), por ejemplo ABC-A1, ABC-G1 o ABC-G4. Así, los agentes de ARNi conjugados con colesterol podrían disfrutar de una captación facilitada mediante células que presentan tales mecanismos de transporte, por ejemplo células del hígado. Como tal, la presente descripción proporciona evidencias y métodos generales para agentes de ARNi de direccionamiento a células que expresan determinados componentes de superficie celular, por ejemplo receptores, mediante conjugación de un ligando natural para tal componente (por ejemplo, colesterol) con el agente de ARNi, o mediante conjugación de un resto químico (por ejemplo, colesterol) con el agente de ARNi que se asocia con o se une a un ligando natural para el componente (por ejemplo, LDL, HDL).

Otras realizaciones

Un agente de ARNi, puede producirse en una célula *in vivo*, por ejemplo, a partir de moldes de ADN exógeno que se suministran a la célula. Por ejemplo, los moldes de ADN pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden suministrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (patente estadounidense n.º 5.328.470), o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057, 1994). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye el vehículo de inserción génica. Los moldes de ADN, por ejemplo, pueden incluir dos unidades de transcripción, una que produce un transcrito que incluye la hebra superior de un agente de ARNi y una que produce un transcrito que incluye la hebra inferior de un agente de ARNi. Cuando se transcriben los moldes, se produce el agente de ARNi, y se procesa en fragmentos de agente de ARNic que median el silenciamiento génico.

Formulación

La presente descripción también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen compuestos de ARNbc. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y de la zona que vaya a tratarse. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles condones recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen aquéllas en las que los ARNbc están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil-etanolamina = DOPE, dimiristoilfosfatidil-colina = DMPC, diestearoilfosfatidil-colina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil-glicerol = DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo = DOTAP y dioleoilfosfatidil-etanolamina = DOTMA), por ejemplo bromuro de (+/-)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloxi)-1-propanamino = GAP-DLRIE). Pueden encapsularse ARNbc dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular a liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNbc pueden complejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres incluyen pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster alquílico C₁₋₁₀ (por ejemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se describen formulaciones tópicas en detalle en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 09/315.298 publicada el 20 de mayo de 1999 .

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosas, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minic comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquéllas en las que se administran ARNbc junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y agentes de quelación. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicolenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio y glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, de sodio). También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos/sales grasos en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen lauril éter de polioxietileno-9, cetil éter de polioxietileno-20. Los ARNbc pueden suministrarse por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secadas por pulverización, o complejarse para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de ARNbc incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poli(acrilatos); poliacrilatos; polioxetanos, poli(cianoacrilatos de alquilo); gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; poli(cianoacrilatos de alquilo); poliiminas derivatizadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes de complejación particularmente preferidos incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiidietilaminometilileno P(TDAE),

5 poliaminoestireno (por ejemplo, p-amino), poli(cianoacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(cianoacrilato de butilo), poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(cianoacrilato de isohexilo), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, poli(acrilato de hexilo), poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones orales para ARNbc y su preparación en detalle en la solicitud estadounidense con n.º de serie 08/886.829 (presentada el 1 de julio de 1997), n.º de serie 09/108.673 (presentada el 1 de julio de 1998), n.º de serie 09/256.515 (presentada el 23 de febrero de 1999), n.º de serie 09/082.624 (presentada el 21 de mayo de 1998) y n.º de serie 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999).

10 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

20 Las formulaciones farmacéuticas, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el/los portador(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, se preparan las formulaciones poniendo en asociación de manera uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

25 Las composiciones pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

30 En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitarse a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque son de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones la conocen generalmente los expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación y puede aplicarse a la formulación de las composiciones.

Emulsiones

35 Las composiciones pueden prepararse y formularse como emulsiones. Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas que superan habitualmente 0,1 µm de diámetro (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, pág. 335; Higuchi *et al.*, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 301). Las emulsiones son a menudo sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad de o bien agua en aceite (w/o) o bien aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas minúsculas en una fase oleosa en masa, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas minúsculas en una fase acuosa en masa, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en o bien la fase acuosa, fase oleosa, la fase oleosa o bien por sí mismo como una fase separada. También pueden estar presentes excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizadores, tintes y antioxidantes en emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que se componen de más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones aceite en agua en aceite (o/w/o) y de agua en aceite en agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas proporcionan a menudo determinadas ventajas que no proporcionan las emulsiones binarias simples. Las emulsiones múltiples en las que gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa proporciona una emulsión o/w/o.

- Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión se dispersa bien en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de cremas y bases de pomada de tipo emulsión. Otros medios de estabilización de emulsiones conllevan el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se clasifican ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes que se producen de manera natural, bases de absorción y sólidos finamente divididos (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes surfactantes, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, pág. 199). Los tensioactivos son normalmente anfífilos y comprenden una parte hidrófila y una hidrófoba. La razón de la naturaleza hidrófila con respecto a la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en la clasificación y selección de tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos pueden clasificarse en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285).
- Los emulsionantes que se producen de manera natural usados en formulaciones de emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y goma arábica. Las bases de absorción presentan propiedades hidrófilas de manera que pueden empaparse con agua para formar emulsiones w/o mientras que conservan sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Los sólidos finamente divididos también se han usado como buenos emulsionantes especialmente en combinación con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Éstos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas sin hinchamiento tales como bentonita, attapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos y sólidos apolares tales como carbono o triestearato de glicerilo.
- Una gran variedad de materiales no emulsionantes también se incluyen en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Éstos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas que se producen de manera natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábica, agar, ácido alginico, carragenanos, goma guar, goma karaya y goma tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Éstos se dispersan o se hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan las emulsiones mediante la formación de fuertes películas interfaciales alrededor de las gotitas de la fase dispersa y aumentando la viscosidad de la fase externa.
- Puesto que las emulsiones contienen a menudo varios componentes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfátidos que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones incorporan a menudo conservantes. Los conservantes usados comúnmente incluidos en formulaciones de emulsión incluyen metil-parabeno, propil-parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a formulaciones de emulsión para impedir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser eliminadores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y agentes sinérgicos antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.
- La aplicación de formulaciones de emulsión a través de vías dermatológicas, orales y parenterales y métodos para su fabricación se ha revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Las formulaciones de emulsión para administración oral se han usado ampliamente debido a su facilidad de formulación, así como la eficacia desde un punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Los laxantes con base de aceite mineral, las vitaminas solubles en lípidos y preparaciones nutritivas ricas en grasas están entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.

En una realización, las composiciones de ARNbc y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una

microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una disolución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica individual (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un aceite en una disolución acuosa de tensioactivo y añadiendo luego una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por tanto, también se han descrito las microemulsiones como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas surfactantes (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente a través de una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. Si la microemulsión es un tipo de agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y tensioactivo usados y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fases se ha estudiado extensamente y ha producido un conocimiento exhaustivo, para un experto en la técnica, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, oleil éteres de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (M0310), monooleato de hexaglicerol (P0310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (M0750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solos o en combinación con cotensioactivos. El cotensioactivo, habitualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial mediante la penetración en la película de tensioactivo y por consiguiente la creación de una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Pueden prepararse microemulsiones, sin embargo, sin el uso de cotensioactivos y se conocen en la técnica sistemas de microemulsiones autoemulsionantes libres de alcohol. La fase acuosa puede ser normalmente, pero no se limita a, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y tri-glicéridos de cadena media (C₈-C₁₂), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C₈-C₁₀ poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son de interés particularmente desde el punto de vista de la solubilización de fármacos y la absorción potenciada de fármacos. Se ha propuesto que las microemulsiones de base lipídica (tanto o/w como w/o) potencian la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Met. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan las ventajas de una solubilización de fármacos mejorada, protección del fármaco frente a hidrólisis enzimática, posible potenciación de la absorción de fármacos debido a alteraciones inducidas por tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral con respecto a formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y toxicidad reducida (Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). A menudo, pueden formarse espontáneamente microemulsiones cuando sus componentes se ponen juntos a la temperatura ambiental. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos o ARNbc termolábiles. Las microemulsiones también han sido eficaces en la administración transdérmica de componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión faciliten la absorción sistémica aumentada de ARNbc y ácidos nucleicos desde el tracto gastrointestinal, así como que mejoren la captación celular local de ARNbc y ácidos nucleicos dentro del tracto gastrointestinal, la vagina, la cavidad bucal y otras zonas de administración.

Las microemulsiones también pueden contener aditivos y componentes adicionales tales como monoestearato de sorbitano (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para potenciar la absorción de los ARNbc y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y compuestos no quelantes y no tensioactivos (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de estas clases se ha analizado anteriormente.

Liposomas

Existen muchas estructuras de tensioactivos organizadas además de las microemulsiones que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Éstas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han atraído un gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración de fármacos. El término "liposoma" significa una vesícula que se compone de lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos presentan la ventaja de poder fusionarse a la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse de manera tan eficaz con la membrana celular, se captan por macrófagos *in vivo*.

Con el fin de atravesar la piel intacta de mamíferos, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro de menos de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por tanto, es deseable usar un liposoma que sea sumamente deformable y que pueda pasar a través de tales poros finos.

Las ventajas adicionales de los liposomas incluyen; los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y solubles en lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos frente al metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial de lípidos, el tamaño de vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y la administración de principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares y a medida que avanza la fusión de los liposomas y la célula, se vacía el contenido liposomal en la célula donde puede actuar el principio activo.

Las formulaciones liposomales han sido el centro de atención de una extensa investigación como el modo de administración para muchos fármacos. Cada vez hay más evidencias de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas con respecto a otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en la diana deseada y la capacidad para administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la piel.

Varios informes han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes incluyendo ADN de alto peso molecular en la piel. Se han administrado compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular a la piel. La mayoría de aplicaciones dio como resultado la selección como diana de la parte superior de la epidermis.

Los liposomas se clasifican en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo de liposomas/ADN cargado positivamente se une a la superficie celular cargada negativamente y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, se rompen los liposomas, liberando su contenido en el citoplasma de la célula (Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente, atrapan el ADN más que complejarse con el mismo. Puesto que tanto el ADN como el lípido están cargados de manera similar, se produce repulsión más que formación de complejo. No obstante, cierta cantidad de ADN queda atrapada dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para suministrar ADN que codifica para el gen de la timidina cinasa a monocapas celulares en cultivo. Se detectó la expresión del gen exógeno en las células diana (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo importante de composición liposomal incluye fosfolípidos distintos a la fosfatidilcolina derivada de manera natural. Pueden formarse composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, a partir de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos se forman generalmente a partir de dimiristoil-fosfatidilglicerol, mientras que se forman liposomas aniónicos fusogénicos principalmente a partir de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE). Se forma otro tipo de composición liposomal a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Se forma otro tipo a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado la administración tópica de formulaciones farmacológicas liposomales a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a piel de cobayas dio como resultado una reducción de úlceras herpéticas cutáneas mientras que la administración de interferón a través de otros medios (por ejemplo, como disolución o como emulsión) fueron ineficaces (Weiner *et al.*, Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410). Además,
 5 un estudio adicional sometió a prueba la eficacia de interferón administrado como parte de una formulación liposomal con respecto a la administración de interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal era superior a la administración acuosa (du Plessis *et al.*, Antiviral Research, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas liposomales no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron
 10 formulaciones liposomales no iónicas que comprende Novasome.TM. I (dilaurato de glicerilo/colesterol/estearil éter de polioxietileno-10) y Novasome.TM. II (diestearato de glicerilo/colesterol/estearil éter de polioxietileno-10) para administrar ciclosporina-A a la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposomales no iónicos eran eficaces para facilitar la deposición de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu *et al.* S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan como resultados vidas de circulación potenciadas con relación a liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquéllos en los que
 15 parte de la parte lipídica de formación de vesículas de los liposomas (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido G_{m1}, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque no desea limitarse por ninguna teoría particular, se cree en la técnica que, al menos para liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados con PEG, la semivida de circulación potenciada de estos liposomas estabilizados estéricamente se deriva de una captación reducida en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al.*, FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu
 20 *et al.*, Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Diversos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos se conocen en la técnica. Papahadjopoulos *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) notificaron la capacidad del monosialogangliósido G_{m1}, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de los liposomas. Estos hallazgos se expusieron por Gabizon *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). La patente estadounidense n.º 4.837.028 y el
 30 documento WO 88/04924, ambos concedidos a Allen *et al.*, dan a conocer liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{m1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La patente estadounidense n.º 5.543.152 (Webb *et al.*) da a conocer liposomas que comprenden esfingomielina. Se dan a conocer liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina en el documento WO 97/13499 (Lim *et al.*).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y métodos de preparación de los mismos, se conocen en la técnica. Sunamoto *et al.* (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C_{1215G}, que contiene un resto de PEG. Illum *et al.* (FEBS Lett., 1984, 167, 79) indicaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre potenciadas significativamente. Se describen fosfolípidos sintéticos modificados mediante la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) por Sears (patentes estadounidenses n.ºs 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov *et al.* (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizados con PEG o
 35 estearato de PEG tienen aumentos significativos en las semividas de circulación en sangre. Blume *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron tales observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Se describen liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente en su superficie externa en la patente europea n.º EP 0 445 131 B1 y el documento WO 90/04384 concedido a Fisher. Se describen composiciones de liposomas que contienen el 1-20 por ciento molar de PE derivatizado con PEG, y métodos de uso de las mismas, por Woodle *et al.* (patentes estadounidenses n.ºs 5.013.556 y 5.356.633) y Martin *et al.* (patente estadounidense n.º 5.213.804 y patente europea n.º EP 0 496 813 B1). Se dan a conocer liposomas que comprenden varios de otros conjugados de lípido-polímero en el documento WO 91/05545 y la patente estadounidense n.º 5.225.212 (ambos concedidos a Martin *et al.*) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky *et al.*). Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en el documento WO 96/10391 (Choi *et al.*). La patente estadounidense n.º 5.540.935 (Miyazaki *et al.*) y la patente estadounidense n.º 5.556.948 (Tagawa *et al.*) describen liposomas que contienen PEG que pueden derivatizarse adicionalmente con restos funcionales en sus superficies.
 40 45 50

Un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos se conocen en la técnica. El documento WO 96/40062 concedido a Thierry *et al.* da a conocer métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente estadounidense n.º 5.264.221 concedida a Tagawa *et al.* da a conocer liposomas unidos a proteína y afirma que el contenido de tales liposomas puede incluir ARNbc. La patente estadounidense n.º 5.665.710 concedida a Rahman *et al.* describe determinados métodos de encapsulación de oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 concedido a Love *et al.* da a conocer liposomas que comprenden ARNbc
 55 60

que seleccionan como diana el gen raf.

Los transfersomas son aún otro tipo de liposomas, y son agregados lipídicos sumamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármacos. Los transfersomas pueden describirse como gotitas de lípido que son tan sumamente deformables que pueden penetrar fácilmente a través de poros que son más pequeños que la gotita. Los transfersomas son adaptables al entorno en el que se usan, por ejemplo presentan autooptimización (adaptativos a la forma de los poros en la piel), presentan autorreparación, frecuentemente alcanzan sus dianas sin fragmentarse, y a menudo presentan autocarga. Para preparar transfersomas es posible añadir activadores de bordes superficiales, habitualmente tensioactivos, a una composición liposomal convencional. Los transfersomas se han usado para administrar albúmina sérica a la piel. La administración mediada por transfersomas de albúmina sérica ha mostrado ser tan eficaz como inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina sérica.

Los tensioactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y categorizar las propiedades de los muchos tipos de tensioactivos diferentes, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como "cabeza") proporciona el medio más útil para categorizar los diferentes tensioactivos usados en las formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y pueden usarse a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB oscilan entre 2 y aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. También están incluidos en esta clase las alcanolamidas y los éteres no iónicos tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados. Los tensioactivos de polioxitileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o se dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acil-lactilatos, acil-amidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tal como alquilsulfatos y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos tales como alquil-bencenosulfonatos, acil-isetionatos, acil-auratos y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los alquilsulfatos y los jabones.

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

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de portar una carga o bien positiva o bien negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados del ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetainas y fosfátidos.

Se ha revisado el uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Potenciadores de la penetración

En una realización, la presente descripción emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficaz de ácidos nucleicos, particularmente ARNbc, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en disolución en formas tanto ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, habitualmente sólo los fármacos solubles en lípidos o fármacos lipófilos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar membranas celulares si la membrana que va a atravesarse se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y compuestos no quelantes y no tensioactivos (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de potenciadores de la penetración se describen a continuación en mayor detalle.

Tensioactivos: en relación con la presente descripción, los tensioactivos (o "agentes surfactantes") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfacial entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de

ARNbc a través de la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, lauril éter de polioxietileno-9 y cetil éter de polioxietileno-20) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43 (Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

5 Ácidos grasos: diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres alquílicos C₁- C₁₀ de los mismos (por ejemplo, metílico, isopropílico y t-butílico), y mono y di-
10 glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

15 Sales biliares: el papel fisiológico de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y la absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (Brunton, capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, págs. 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Por tanto la expresión "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes de la bilis que se producen de manera natural así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido deshidrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y lauril éter de polioxietileno-9 (POE) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, capítulo 39 en: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

30 Agentes quelantes: los agentes quelantes, pueden definirse como compuestos que retiran iones metálicos de una disolución mediante la formación de complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de ARNbc a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de ADNasa, como las nucleasas de ADN más caracterizadas requieren un ion metálico divalente para catálisis y por tanto se inhiben por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes incluyen pero no se limitan a etilendiaminotetraacetato de disodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados de N-acilo de colágeno, lauril éter-9 y derivados de N-amino-acilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

40 Compuestos no quelantes y no tensioactivos: tal como se usa en el presente documento, los compuestos potenciadores de la penetración no quelantes y no tensioactivos pueden definirse como compuestos que demuestran una actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que, no obstante, potencian la absorción de ARNbc a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-álquil y 1-alquenilazaciclo-alcanona (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

También pueden añadirse agentes que potencian la captación de ARNbc a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tales como Lipofectin (Junichi *et al.*, patente estadounidense n.º 5.705.188), derivados catiónicos de glicerol y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo *et al.*, solicitud PCT WO 97/30731) y otros péptidos, también se conocen para potenciar la captación celular de ARNbc.

50 Pueden utilizarse otros agentes para potenciar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

Portadores

55 Determinadas composiciones también incorporan compuestos portadores en la formulación. Tal como se usa en el presente documento, "compuesto portador" o "portador" puede referirse a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no presenta actividad biológica *per se*) pero se reconoce como ácido nucleico mediante procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica mediante, por

ejemplo, la degradación del ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su retirada de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto portador, normalmente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto portador y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNbc parcialmente fosforotioado en tejido hepático puede reducirse cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

En contraposición a un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona teniendo en cuenta la manera planificada de administración con el fin de proporcionar el volumen, consistencia, etc., deseados cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los portadores farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico; estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

También pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con ácidos nucleicos para formular las composiciones. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para la administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas líquidas o sólidas. Las disoluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Composiciones farmacéuticas para la administración al aparato respiratorio

Otro aspecto prevé la administración de agentes de ARNi al aparato respiratorio, particularmente para el tratamiento de fibrosis quística. El aparato respiratorio incluye las vías respiratorias altas, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguido por las vías respiratorias bajas, que incluyen la tráquea seguido por bifurcaciones en los bronquios y bronquiolos. Las vías respiratorias altas y bajas se denominan vías respiratorias conductoras. Los bronquiolos terminales se dividen entonces en bronquiolos respiratorios que conducen luego a la zona respiratoria final, los alveolos, o pulmón profundo. El epitelio de las vías respiratorias conductoras es la diana principal de los aerosoles terapéuticos inhalados para la administración de agentes de ARNi tales como agentes de ARNi de alfa-ENaC.

Las composiciones de administración pulmonar pueden administrarse mediante inhalación por el paciente de una dispersión de modo que la composición, preferiblemente el agente de ARNi, dentro de la dispersión pueda alcanzar el pulmón en el que puede, por ejemplo, absorberse fácilmente a través de la región alveolar directamente a la circulación sanguínea. La administración pulmonar puede ser eficaz tanto para la administración sistémica como para la administración localizada para tratar enfermedades de los pulmones.

La administración pulmonar puede lograrse mediante diferentes enfoques, incluyendo el uso de formulaciones nebulizadas, aerosolizadas, micelulares y a base de polvos secos; la administración mediante inhalación puede ser oral y/o nasal. La administración puede lograrse con nebulizadores de líquido, inhaladores basados en aerosoles y dispositivos de dispersión de polvos secos. Se prefieren los dispositivos de dosis medida. Uno de los beneficios de usar un atomizador o inhalador es que se minimiza el potencial de contaminación porque los dispositivos son autocontenidos. Los dispositivos de dispersión de polvos secos, por ejemplo, suministran fármacos que pueden formularse fácilmente como polvos secos. Una composición de ARNi puede almacenarse de manera estable como polvos liofilizados o secados por pulverización por sí mismos o en combinación con portadores en polvo adecuados.

La administración de una composición para inhalación puede estar mediada por un elemento de sincronización de la dosificación que puede incluir un temporizador, un contador de dosis, un dispositivo de medida del tiempo o un indicador temporal que cuando se incorpora en el dispositivo permite el seguimiento de las dosis, la monitorización del cumplimiento y/o la activación de dosis a un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

5 Los ejemplos de dispositivos farmacéuticos para la administración de aerosoles incluyen inhaladores de dosis medida (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI) y nebulizadores por chorro de aire. Se describen sistemas de administración mediante inhalación a modo de ejemplo que pueden adaptarse fácilmente para la administración de los agentes de ARNi objeto en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.756.353; 5.858.784; y las solicitudes PCT WO98/31346; WO98/10796; WO00/27359; WO01/54664; WO02/060412. Otras formulaciones de aerosol que pueden usarse para administrar los agentes de ARNi se describen en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.294.153; 6.344.194; 6.071.497, y las solicitudes PCT WO02/066078; WO02/053190; WO01/60420; WO00/66206. Además, pueden adaptarse métodos para administrar agentes de ARNi a partir de los usados en la administración de otros oligonucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) mediante inhalación, tal como se describe en Templin *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, 10:359-68; Sandrasagra *et al.*, *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1:979-83; Sandrasagra *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12:177-81.

La administración de los agentes también puede implicar la administración de los denominados “profármacos”, es decir, formulaciones o modificaciones químicas de una sustancia terapéutica que requieren alguna forma de procesamiento o transporte por sistemas innatos en el organismo del sujeto para liberar la sustancia terapéutica, preferiblemente en el sitio en el que se desea su acción; esta última realización puede usarse junto con la administración del aparato respiratorio, pero también junto con otras realizaciones de la presente descripción. Por ejemplo, los pulmones humanos pueden eliminar o degradar rápidamente aerosoles depositados escindibles hidrolíticamente a lo largo de periodos que oscilan entre minutos y horas. En las vías respiratorias altas, los epitelios ciliados contribuyen al “escalador mucociliar” mediante el cual se barren partículas de las vías respiratorias hacia la boca. Pavia, D., “Lung Mucociliary Clearance,” en *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S. W. y Pavia, D., Eds., Butterworths, Londres, 1984. En los pulmones profundos, los macrófagos alveolares pueden fagocitar partículas poco después de su deposición. Warheit *et al.* *Microscopy Res. Tech.*, 26: 412-422 (1993); y Brain, J. D., “Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages,” en *The Reticuloendothelial System*, S. M. Reichard y J. Filkins, Eds., Plenum, Nueva York., págs. 315-327, 1985.

En realizaciones preferidas, particularmente cuando se desea la dosificación sistémica con el agente de ARNi, se formulan los agentes de ARNi aerosolizados como micropartículas. Las micropartículas que tienen un diámetro de entre 0,5 y diez micrómetros pueden penetrar en los pulmones, pasando a través de la mayoría de las barreras naturales. Se requiere un diámetro de menos de diez micrómetros para sortear la garganta; se requiere un diámetro de 0,5 micrómetros o mayor para evitar exhalarse.

Otros componentes

35 Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes que se encuentran de manera convencional en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de utilización establecidos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos, compatibles adicionales tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tal como tintes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir indebidamente en las actividades biológicas de los componentes de las composiciones. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionen de manera perjudicial con el/los ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

50 Determinadas realizaciones proporcionan combinaciones y composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más agentes de ARNbc y (b) uno o más de otros agentes terapéuticos que funcionan mediante un mecanismo sin interferencia por ARN.

Por consiguiente, la descripción incluye una combinación de un ARNi con una sustancia farmacológica antiinflamatoria, broncodilatadora, antihistamínica, antitusiva, antibiótica o de ADNasa, estando dicho bloqueante del canal de sodio epitelial y dicha sustancia farmacológica en la misma composición farmacéutica o una diferente.

Los antibióticos adecuados incluyen antibióticos macrólidos, por ejemplo, tobramicina (TOBIT[™]).

Las sustancias farmacológicas de ADNasa adecuadas incluyen dornasa alfa (Pulmozyme[™]), una disolución altamente purificada de desoxirribonucleasa I humana recombinante (rhADNasa), que escinde selectivamente el ADN. La dornasa alfa se usa para tratar la fibrosis quística.

- 5 Otras combinaciones útiles de bloqueantes del canal de sodio epitelial con fármacos antiinflamatorios son aquellas con antagonistas de receptores de quimiocinas, por ejemplo, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, particularmente antagonistas de CCR-5, tales como los antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; antagonistas de Takeda, tales como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metil-fenil)-5H-benzo-ciclohepten-8-il]carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahydro-
10 N,N-dimetil-2H-piran-4-aminio (TAK-770); y antagonistas de CCR-5 descritos en los documentos USP 6.166.037 (particularmente las reivindicaciones 18 y 19), WO00/66558 (particularmente la reivindicación 8), WO 00/66559 (particularmente la reivindicación 9), WO 04/018425 y WO 04/026873.

- 15 Los fármacos antiinflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular, glucocorticosteroides, tales como budesonida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, ciclesonida o furoato de mometasona, o esteroides descritos en los documentos WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (especialmente los de los ejemplos 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 y 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 y WO 04/66920; agonistas de receptores de glucocorticoides no esteroideos, tales como los descritos en los documentos DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 20 04/18429, WO 04/19935 y WO 04/26248; antagonistas de LTD4, tales como montelukast y zafirlukast; inhibidores de PDE4, tales como cilomilast (Ariflo[®] GlaxoSmithKline), roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659 / PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y los dados a conocer en los documentos WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 y WO 04/037805; antagonistas del receptor de adenosina A2B tales como los descritos en el documento WO 02/42298; y agonistas de receptores adrenérgicos beta-2, tales como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol fenoterol, procaterol, y especialmente, formoterol, carmoterol y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de fórmula (I) del documento WO 0075114, preferiblemente compuestos de los ejemplos del mismo, especialmente indacaterol y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, así como compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de fórmula (I) del documento WO 04/16601, y también compuestos de los documentos EP 1440966, JP 35 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, USP 2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164, WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/16578, WO 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO 04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618, WO 04/46083, WO 04/80964, WO 04/108765 y WO 04/108676.

- 40 Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular, bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi) y glicopirrolato, pero también los descritos en los documentos EP 424021, USP 3.714.357, USP 5.171.744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 y WO 04/05285.

- 45 Los fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores dobles adecuados incluyen antagonistas muscarínicos/agonistas del receptor adrenérgico beta-2 dobles tales como los dados a conocer en los documentos USP 2004/0167167, WO 04/74246 y WO 04/74812.

- 50 Las sustancias farmacológicas antihistamínicas adecuadas incluyen clorhidrato de cetirizina, paracetamol, fumarato de clemastina, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como las dadas a conocer en los documentos JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

- 55 Otras combinaciones útiles de agentes con fármacos antiinflamatorios son aquellas con antagonistas de receptores de quimiocinas, por ejemplo, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, particularmente antagonistas de CCR-5, tales como los antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; antagonistas de Takeda, tales como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metilfenil)-5H-benzo-ciclohepten-8-il]carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahydro-N,N-dimetil-2H-piran-4-aminio (TAK-770) y antagonistas de CCR-5 descritos en los documentos USP 6.166.037 (particularmente las reivindicaciones 18 y 19), WO 00/66558 (particularmente la reivindicación 8), WO 00/66559 (particularmente la reivindicación 9), WO 04/018425 y WO 04/026873.

También pueden seleccionarse otros agentes terapéuticos adicionales útiles del grupo que consiste en moléculas de unión a citocinas, particularmente anticuerpos de otras citocinas, en particular una combinación con un anticuerpo anti-IL4, tal como se describe en el documento PCT/EP2005/00836, un anticuerpo anti-IgE, tal como Xolair®, un anticuerpo anti-IL31, un anticuerpo anti-IL31R, un anticuerpo anti-TSLP, un anticuerpo anti-receptor de TSLP, un anticuerpo anti-endoglina, un anticuerpo anti-IL1b o un anticuerpo anti-IL13, tal como se describe en el documento WO05/007699.

Pueden usarse juntos dos o más compuestos combinados en una única formulación, por separado, de manera concomitante o de manera secuencial.

Puede determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de composiciones se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la descripción, puede estimarse la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto de polipéptido de una secuencia diana (por ejemplo, logrando una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición que es la mitad de la máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Puede usarse tal información para determinar más exactamente dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, tal como se analizó anteriormente, los ARNbc pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de trastornos relacionados con ENaC. En cualquier caso, el médico que lo administra puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de ARNbc basándose en los resultados observados usando medidas de eficacia convencionales conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Métodos de tratamiento y vías de administración

Una composición que incluye un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi que selecciona como diana alfa-ENaC, puede administrarse a un sujeto por una variedad de vías para lograr o bien la administración local en el sitio de acción o bien la administración sistémica al sujeto. Las vías a modo de ejemplo incluyen la administración local directa al sitio de tratamiento, tal como los pulmones y el conducto nasal así como la administración intravenosa, nasal, oral y ocular. El medio preferido de administración de los agentes de ARNi es a través de administración directa a los pulmones y el conducto nasal como líquido, aerosol o disolución nebulizada.

Las formulaciones para inhalación o administración parenteral se conocen bien en la técnica. Tal formulación puede incluir disoluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Para uso intravenoso, la concentración total de solutos debe controlarse para hacer la preparación isotónica.

Los compuestos activos dados a conocer en el presente documento se administran preferiblemente al/a los pulmón/pulmones o al conducto nasal de un sujeto mediante cualquier medio adecuado. Los compuestos activos pueden administrarse mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables constituidas por el compuesto activo o los compuestos activos, que inhala el sujeto. El compuesto activo puede aerosolizarse en una variedad de formas, tales como, pero sin limitarse a, inhaladores de polvo seco, inhaladores de dosis medida o suspensiones líquido/líquido. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas pueden contener opcionalmente otros componentes terapéuticos tales como amilorida, benzamil o fenamil, estando incluido el compuesto seleccionado en una cantidad eficaz para inhibir la reabsorción de agua de las secreciones mucosas de las vías respiratorias, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.501.729.

La composición farmacéutica particulada puede combinarse opcionalmente con un portador con el fin de ayudar en la dispersión o el transporte. Un portador adecuado tal como un azúcar (es decir lactosa, sacarosa, trehalosa, manitol) puede mezclarse con el compuesto o compuestos activos en cualquier razón adecuada (por ejemplo, una razón 1 a 1 en peso).

Las partículas constituidas por el compuesto activo deben incluir partículas de tamaño respirable, es decir, partículas de un tamaño lo suficientemente pequeño como para pasar a través de la boca o nariz y la laringe por inhalación y a los bronquios y alveolos de los pulmones. En general, las partículas que oscilan entre aproximadamente 1 y 10 micrómetros de tamaño (más particularmente, de menos de aproximadamente 5 micrómetros de tamaño) son respirables. Las partículas de tamaño no respirable que están incluidas en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y a ser tragadas, y la cantidad de partículas no respirables en el aerosol se minimiza preferiblemente. Para la administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula en el intervalo de 10-500 µM con el fin de garantizar la retención en la cavidad nasal.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas líquidas de compuesto activo para producir un aerosol mediante combinación del compuesto activo con un vehículo adecuado, tal como agua estéril libre de pirógenos. Las disoluciones de sal hipertónicas usadas son preferiblemente disoluciones estériles libres de pirógenos, que comprenden desde el uno hasta el quince por ciento (en peso) de la sal fisiológicamente aceptable, y más preferiblemente desde el tres hasta el siete por ciento en peso de la sal fisiológicamente aceptable.

Pueden producirse aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto activo mediante cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de chorro impulsado a presión o un nebulizador ultrasónico. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman las disoluciones o suspensiones del principio activo en una nebulización de aerosol terapéutico por medio de aceleración con un gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un orificio Venturi estrecho o por medio de agitación ultrasónica.

Las formulaciones adecuadas para uso en nebulizadores consisten en el principio activo en un portador líquido, comprendiendo el principio activo hasta el 40% p/p de la formulación, pero preferiblemente menos del 20% p/p. El portador es normalmente agua (y lo más preferiblemente agua estéril libre de pirógenos) o una disolución acuosa-alcohólica diluida, que se hace preferiblemente isotónica, pero puede ser hipertónica con líquidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se ha hecho estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes tamponantes y tensioactivos.

Asimismo pueden producirse aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto activo con cualquier generador de aerosol terapéutico particulado sólido. Los generadores de aerosol para administrar agentes terapéuticos particulados sólidos a un sujeto producen partículas que son respirables y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un agente terapéutico a una tasa adecuada para la administración a seres humanos. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol particulado sólido es un insuflador. Las formulaciones adecuadas para administración por insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden administrarse por medio de un insuflador o absorberse en la cavidad nasal a modo de una aspiración nasal. En el insuflador, el polvo (por ejemplo, una dosis medida del mismo eficaz para llevar a cabo los tratamientos descritos en el presente documento) está contenido en cápsulas o cartuchos, compuestos normalmente por gelatina o plástico, que o bien se perforan o bien se abren *in situ* y el polvo se administra por el aire aspirado a través del dispositivo por inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste únicamente en el principio activo o en una mezcla de polvo que comprende el principio activo, un diluyente de polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El principio activo comprende normalmente desde el 0,1 hasta el 100 p/p de la formulación.

Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo comprende un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados, que contienen normalmente una formulación de suspensión o disolución del principio activo en un propelente licuado. Durante el uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido, normalmente de desde 10 hasta 200 µl, a fin de producir una pulverización de partículas finas que contiene el principio activo. Los propelentes adecuados incluyen determinados compuestos de clorofluorocarbonos, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más codisolventes, por ejemplo, etanol, tensioactivos, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidante y agentes aromatizantes adecuados.

Puede incorporarse un agente de ARNi en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una o más especies de un agente de ARNi y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en lo que respecta a cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Pueden incorporarse también en las composiciones compuestos activos suplementarios.

5 La administración puede proporcionarla el sujeto u otra persona, por ejemplo, un cuidador. Un cuidador puede ser cualquier entidad implicada en proporcionar atención al ser humano: por ejemplo, un hospital, hospicio, consultorio médico, clínica de pacientes ambulatorios; un trabajador sanitario tal como un médico, enfermero u otro especialista; o un cónyuge o tutor, tal como un progenitor. La medicación puede proporcionarse en dosis medidas o en un dispensador que administra una dosis medida.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad presente en la composición que es necesaria para proporcionar el nivel deseado de fármaco al sujeto que va a tratarse para proporcionar la respuesta fisiológica prevista.

10 La expresión “cantidad fisiológicamente eficaz” es aquella cantidad administrada a un sujeto para proporcionar el efecto paliativo o curativo deseado.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” significa que el portador puede captarse en los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos en los pulmones.

15 El término “coadministración” hace referencia a la administración a un sujeto de dos o más agentes, y en particular dos o más agentes de ARNi. Los agentes pueden estar contenidos en una única composición farmacéutica y administrarse al mismo tiempo, o los agentes pueden estar contenidos en formulaciones separadas y administrarse en serie a un sujeto. Siempre que los dos agentes puedan detectarse en el sujeto al mismo tiempo, se dice que los dos agentes se coadministran.

20 Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portador incluyen estabilizadores tales como albúmina sérica humana (HSA), agentes de carga tales como hidratos de carbono, aminoácidos y polipéptidos; agentes de ajuste del pH o tampones; sales tales como cloruro de sodio, y similares. Estos portadores pueden estar en forma cristalina o amorfa, o pueden ser una mezcla de ambos.

25 Los agentes de carga que son particularmente valiosos incluyen hidratos de carbono, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones compatibles de los mismos. Los hidratos de carbono adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de hidratos de carbono incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas y manitol. Los polipéptidos adecuados incluyen aspartamo. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, prefiriéndose glicina.

30 Los agentes de ajuste del pH o tampones adecuados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicas, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, y similares; se prefiere citrato de sodio.

Dosificación

35 Puede administrarse un agente de ARNi a una dosis de menos de aproximadamente 75 mg por kg de peso corporal, o menos de aproximadamente 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 ó 0,0005 mg por kg de peso corporal, y menos de 200 nmol de agente de ARNi (por ejemplo, aproximadamente $4,4 \times 10^{16}$ copias) por kg de peso corporal, o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 nmol de agente de ARNi por kg de peso corporal. La dosis unitaria, por ejemplo, puede administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o intramuscular, por vía intratecal o directamente en un órgano), una dosis inhalada o una aplicación tópica.

40 La dosificación puede ser una cantidad eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno. Puede administrarse de manera profiláctica o como la parte principal o una parte de un protocolo de tratamiento.

45 En una realización, la dosis unitaria se administra de manera menos frecuente que una vez al día, por ejemplo menor de cada 2, 4, 8 ó 30 días. En otra realización, la dosis unitaria no se administra con una frecuencia (por ejemplo, no con una frecuencia regular). Por ejemplo, la dosis unitaria puede administrarse una sola vez. Dado que el silenciamiento mediado por el agente de ARNi puede persistir durante varios días después de la administración de la composición del agente de ARNi, en muchos casos, es posible administrar la composición con una frecuencia de menos de una vez al día o, en algunos casos, sólo una vez durante todo el régimen terapéutico.

50 En una realización, se administra a un sujeto una dosis inicial, y una o más dosis de mantenimiento de un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNic, (por ejemplo, un precursor, por ejemplo un agente de ARNi mayor que puede procesarse en un agente de ARNic, o un ADN que codifica para un agente de ARNi, por ejemplo un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNic, o precursor del mismo). La o las dosis de mantenimiento son generalmente menores que la dosis inicial, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir el tratamiento del sujeto con una dosis o dosis que oscilan entre 0,01 y 75 mg/kg de

5 peso corporal al día, por ejemplo, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 ó 0,0005 mg por kg de peso corporal al día. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente no más de una vez cada 5, 10 ó 30 días. Además, el régimen de tratamiento puede durar un periodo de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, su gravedad y el estado global del paciente. En realizaciones preferidas, la dosificación puede administrarse no más de una vez al día, por ejemplo no más de una vez cada 24, 36, 48 o más horas, por ejemplo no más de una vez cada 5 u 8 días. Tras el tratamiento, puede monitorizarse el paciente para determinar cambios en su estado y para determinar el alivio de los síntomas del estado patológico. La dosificación del compuesto puede o bien aumentarse en el caso de que el paciente no responda significativamente a los niveles de dosificación actuales, o bien puede disminuirse la dosis si se observa un alivio de los síntomas del estado patológico, si el estado patológico ha desaparecido, o si se observan efectos secundarios indeseables.

10 La dosis eficaz puede administrarse en una única dosis o en dos o más dosis, según se desee o considere apropiado en las circunstancias específicas. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, puede ser recomendable la implantación de un dispositivo de administración, por ejemplo, una bomba, endoprótesis semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un depósito.

15 Tras el tratamiento satisfactorio, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, en la que se administra el compuesto en dosis de mantenimiento, que oscilan entre 0,001 g y 100 g por kg de peso corporal (véase el documento US 6.107.094).

20 La concentración de la composición del agente de ARNi es una cantidad suficiente para ser eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno o para regular un estado fisiológico en seres humanos. La concentración o cantidad de agente de ARNi administrada dependerá de los parámetros determinados para el agente y el método de administración, por ejemplo, nasal, bucal o pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones nasales tienden a requerir concentraciones mucho menores de algunos componentes con el fin de evitar irritación o ardor en los conductos nasales. A veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces con el fin de proporcionar una formulación nasal adecuada.

25 Determinados factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a la gravedad de la enfermedad o el trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Se apreciará también que la dosificación eficaz de un agente de ARNi tal como un agente de ARNic usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del transcurso de un tratamiento particular. Pueden resultar cambios en la dosificación y hacerse evidentes a partir de los resultados de ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, puede monitorizarse el sujeto después de la administración de una composición de agente de ARNi. Basándose en la información de la monitorización, puede administrarse una cantidad adicional de la composición del agente de ARNi.

35 La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado patológico que va a tratarse, durando el transcurso del tratamiento desde varios días hasta varios meses, o hasta que se obtenga una curación o se logra una disminución del estado patológico. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de las mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente dosificaciones, metodologías de dosificación y tasas de repetición óptimas. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo* tal como se describió anteriormente.

40 Los agentes de ARNi tal como se describen en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento y (cuando sea apropiado) en la prevención de una cualquiera de los siguientes enfermedades/trastornos;

Fibrosis quística, síndrome de Liddle, insuficiencia renal, hipertensión, desequilibrios hidroelectrolíticos.

45 En particular, en algunas realizaciones, los agentes de ARNi pueden usarse para tratar y/o prevenir manifestaciones clínicas adversas de estas enfermedades/trastornos.

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos adicionalmente.

Ejemplos

Fuente de reactivos

50 Cuando la fuente de un reactivo no se facilita específicamente en el presente documento, tal reactivo puede obtenerse de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular a una calidad/pureza convencional para su aplicación en biología molecular.

Ejemplo 1: Selección de secuencias

Con el fin de identificar ARNic para modular por disminución la expresión de la subunidad alfa del canal de sodio epitelial ENaC (α -ENaC), se definieron conjuntos de selección basándose en un análisis bioinformático. Los controladores clave para el diseño del conjunto de selección fueron la especificidad pronosticada de los ARNic contra el transcriptoma de la especie relevante. Para la identificación de ARNic para alfa-ENaC y un sistema de administración eficaz, se usó un enfoque de tres pasos: Se seleccionó la rata como especie de prueba para abordar la eficacia del silenciamiento *in vivo* tras la administración intratraqueal, se seleccionó la cobaya como organismo modelo de enfermedad para demostrar que la reducción de ARNm de alfa-ENaC da como resultado un efecto funcional medible. La molécula de ARNic terapéutica tiene que seleccionar como diana alfa-ENaC humano así como la secuencia de alfa-ENaC de al menos una especie relevante para la toxicología, en este caso, mono rhesus.

El análisis inicial de la secuencia de ARNm de alfa-ENaC relevante reveló que pueden identificarse pocas secuencias que satisfacen los requisitos de especificidad y al mismo tiempo seleccionan como diana ARNm de alfa-ENaC en todas las especies relevantes. Por tanto, se decidió diseñar conjuntos de selección independientes para el ARNic terapéutico y para las moléculas sustitutas que van a someterse a prueba en el modelo de enfermedad relevante (tablas 1A, 1B, 1C y 1D).

Todos los ARNic reconocen la secuencia de alfa-ENaC humana, ya que se seleccionó un sistema de cultivo de células humanas para la determinación de la actividad *in vitro* (H441, véase a continuación). Por tanto, pueden usarse todos los ARNic para seleccionar como diana ARNm de alfa-ENaC humano en un entorno terapéutico.

Se diseñaron los conjuntos de selección terapéuticos para que contuviesen sólo secuencias de ARNic que son completamente complementarias a las secuencia de alfa-ENaC de mono rhesus y ser humano.

Diseño y selección *in silico* de ARNic que seleccionan como diana alfa-ENaC (SCNN1A)

Se llevó a cabo el diseño de ARNic para identificar ARNic para los cuatro conjuntos definidos previamente (véase anteriormente)

- a) "Conjunto de selección inicial"
- 25 b) "Conjunto de selección extendido"
- c) "Conjunto sustituto *in vivo* para rata"
- d) "Conjunto sustituto *in vivo* para cobaya"

Conjunto de selección inicial

El objetivo de la selección *in silico* de un conjunto de selección inicial era identificar ARNic que seleccionan como diana específicamente alfa-ENaC humano, así como su ortólogo de mono rhesus. Se descargó el ARNm diana humano (NM_001038.4) de un recurso del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) durante el procedimiento de selección de ARNic completo. Con el fin de identificar el ortólogo de rhesus de alfa-ENaC (*Macaca mulatta*), se usó la secuencia humana en una búsqueda en BLASTN en el Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Mmulatta>) frente a cóntigos de Mmulatta a partir del 01-10-2004. Se extrajeron todas las regiones de aciertos y se ensamblaron mediante la herramienta de ensamblaje CAP para generar una primera secuencia de ensamblaje. Además, se realizó una búsqueda en BLAST con la secuencia humana en UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Rhesus&db=rheMac2&hgsid=84859356>) frente a Rhesus congelado el 12 de marzo de 2005. Se descargó el acierto de entramado 84554 y se usó junto con la primera secuencia de ensamblaje mediante CAP para generar la secuencia consenso final para alfa-ENaC de rhesus.

Tras la extracción de todas las secuencias de 19 meros solapantes del ARNm humano, se identificaron 19 meros conservados que tenían secuencias idénticas en la secuencia consenso de rhesus ensamblada. Se definieron las secuencias de 19 meros como el grupo de secuencias de ARNic (sentido) que presentan reacción cruzada entre ser humano-rhesus, representadas por 19 meros de 1185.

Se generaron las secuencias antisentido correspondientes y se sometieron a prueba para determinar su especificidad en ser humano. Para esto, se tomó como parámetro su potencial pronosticado para interactuar con ARNm diana irrelevantes (potencial inespecífico). Se definieron secuencias con bajo potencial inespecífico como preferibles y se pronostica que son más específicas.

Para la selección adicional, se clasificaron los ARNic candidatos según su potencial pronosticado para interactuar con otras secuencias del huésped (en este caso, sin limitación, ser humano). Se supone que ARNic con bajo potencial inespecífico son más específicos *in vivo*. Para pronosticar el potencial inespecífico específico de ARNic, se hicieron las siguientes suposiciones:

- 5 1) Puede deducirse el potencial inespecífico de una hebra a partir del número y la distribución de apareamientos erróneos con una diana inespecífica.
- 2) La diana inespecífica más relevante, que es el que se pronostica que tiene la probabilidad más alta de silenciarse debido a la tolerancia de apareamientos erróneos, determina el potencial inespecífico de la hebra.
- 10 3) Las posiciones 2 a 9 (contando de 5' a 3') de una hebra (región simiente) pueden contribuir más al potencial inespecífico que el resto de la secuencia (que es la región no simiente y de sitios de escisión) (Haley, B., y Zamore, P.D., Nat Struct Mol Biol. 2004, 11:599).
- 4) Las posiciones 10 y 11 (contando de 5' a 3') de una hebra (región de sitios de escisión) pueden contribuir más al potencial inespecífico que la región no simiente (que son las posiciones 12 a 18, contando de 5' a 3').
- 5) Las posiciones 1 y 19 de cada hebra no son relevantes para las interacciones inespecíficas.
- 15 6) El potencial inespecífico puede expresarse mediante la puntuación inespecífica de la diana inespecífica más relevante, calculada basándose en el número y la posición de apareamientos erróneos de la hebra con la región más homóloga en el gen inespecífico considerando las suposiciones 3 a 5.
- 7) Suponiendo una posible supresión de la actividad de la hebra sentido por las modificaciones internas introducidas, sólo será relevante el potencial inespecífico de la hebra antisentido.

- 20 Para identificar posibles genes inespecíficos, se sometieron secuencias antisentido de 19 meros a una búsqueda de homología frente a secuencias de ARNm humanas disponibles públicamente, que se supone que representan el transcriptoma completo humano.

Para este fin, se realizaron búsquedas en fastA (versión 3.4) con todas las secuencias de 19 meros frente a la base de datos RefSeq humana (versión disponible de <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/> el 18 de noviembre de 2005). Se ejecutó la búsqueda en FastA con parámetros-valores-pares -f 30 -g 30 con el fin de tener en cuenta la homología a lo largo de la longitud completa del 19 mero sin ningún hueco. Además, con el fin de garantizar el listado de todos los aciertos inespecíficos relevantes en el archivo de salida de fastA, se usó el parámetro -E 15000.

La búsqueda dio como resultado una lista de posibles dianas inespecíficas para cada secuencia de entrada enumerada descendiendo la homología de secuencia a lo largo del 19 mero completo.

- 30 Para clasificar todas las posibles dianas inespecíficas según las suposiciones 3 a 5, y mediante esto identificar el gen inespecífico más relevante y su puntuación inespecífica, se analizaron los archivos de salida de fastA mediante una secuencia de comandos PERL.

La secuencia de comandos extrajo las siguientes propiedades inespecíficas para cada secuencia de entrada de 19 meros y cada gen inespecífico para calcular la puntuación inespecífica:

- 35 Número de apareamientos erróneos en la región no simiente

Número de apareamientos erróneos en la región simiente

Número de apareamientos erróneos en la región de sitios de escisión

Se calculó la puntuación inespecífica considerando las suposiciones 3 a 5 tal como sigue:

$$\begin{aligned}
 & \text{Puntuación inespecífica} = \text{número de apareamientos erróneos simiente} * 10 \\
 40 & \quad + \text{número de apareamientos erróneos de sitios de escisión} * 1,2 \\
 & \quad + \text{número de apareamientos erróneos no simiente} * 1
 \end{aligned}$$

Se definió el gen inespecífico más relevante para cada secuencia de 19 meros como el gen con la puntuación inespecífica más baja. Por consiguiente, se definió que la puntuación inespecífica más baja era representativa del

potencial inespecífico de cada ARNic, representado por la secuencia antisentido de 19 meros analizada.

Se usó el potencial inespecífico calculado como parámetro de clasificación (en sentido descendente de la puntuación inespecífica) con el fin de generar una clasificación para todas las secuencias de ARNic con reactividad cruzada entre ser humano-rhesus.

- 5 Se definió una puntuación inespecífica de 3 o más como un requisito previo para la selección de ARNic, mientras que se excluyeron todas las secuencias que contenían 4 o más G en una fila (secuencias de poli-G), conduciendo a la selección de un total de 152 ARNic que seleccionan como diana ENaC alfa de ser humano y rhesus (véase la tabla 1a).

Conjunto de selección extendido

- 10 El objetivo de la selección *in silico* del conjunto de selección extendida era identificar todos los ARNic adicionales que seleccionan como diana alfa-ENaC humano con suficiente especificidad, que se excluyeron del conjunto inicial debido a la falta de reactividad cruzada con rhesus. Se tomaron las secuencias restantes del grupo de 19 meros derivados de alfa-ENaC humano que no se habían analizado antes y se generaron las secuencias antisentido correspondientes. Se calcularon el gen inespecífico más relevante y sus puntuaciones inespecíficas correspondientes tal como se describe en la sección "conjunto de selección inicial".

- 15 Para determinar la reactividad cruzada con ratón y cobaya (*Cavia porcellus/cobaya*), se descargaron secuencias de alfa-ENaC de estas especies de la base de datos ¹ de nucleótidos del NCBI (números de registro NM_011324.1 y AF071230 (longitud completa)/DQ109811 (cds parcial), respectivamente). Se usaron las dos secuencias de cobaya para generar una secuencia consenso de alfa-ENaC de cobaya. Se sometió a prueba cada secuencia de 19 meros humana para detectar su presencia en las secuencias de ratón y cobaya. Se asignaron secuencias positivas al grupo de secuencias de ARNic (sentido) que presentan reactividad cruzada entre ser humano-ratón, o secuencias de ARNic (sentido) que presentan reactividad cruzada entre ser humano-cobaya. Tras la exclusión de todas las secuencias de poli-G, se seleccionaron secuencias con puntuaciones inespecíficas de 3 o más así como aquellas con puntuaciones inespecíficas de 2,2 ó 2,4 y reactividad cruzada con ratón, rhesus o cobaya. El número total de ARNic en el grupo de selección extendido era de 344 (véase la tabla 1b).

Conjunto sustituto de rata *in vivo*

- El objetivo de la selección *in silico* del conjunto sustituto de rata *in vivo* era identificar todos los ARNic que seleccionan como diana alfa-ENaC de ser humano y rata con suficiente especificidad en rata. Para la identificación de ARNic que presentan reactividad cruzada entre ser humano-rata, se descargó la secuencia de ARNm de alfa-ENaC de rata de la base de datos de nucleótidos del NCBI (número de registro, NM_031548.2), y se sometieron a prueba todas las secuencias del grupo de 19 meros humanos para detectar su presencia en la secuencia de rata, que representa el conjunto de secuencias de ARNic (sentido) que presentan reactividad cruzada entre ser humano-rata.

- 35 Se generaron las secuencias antisentido correspondientes y se sometieron a prueba para determinar su especificidad en rata. Para esto, se calcularon el gen inespecífico más relevante en rata y sus puntuaciones inespecíficas correspondientes tal como se describe en la sección "conjunto de selección inicial" usando el conjunto de ARNm de rata (base de datos RefSeq) en lugar de los transcritos humanos. Tras la exclusión de todas las secuencias de poli-G, se generó una clasificación considerando la puntuación inespecífica de rata en primera prioridad y la puntuación inespecífica humana con segunda prioridad. Se seleccionaron finalmente las 48 secuencias de la parte superior de la lista que representan el conjunto sustituto de rata *in vivo* (véase la tabla 1c).

Conjunto sustituto de cobaya *in vivo*

- 45 El objetivo de la selección *in silico* del conjunto sustituto de cobaya *in vivo* era identificar todos los ARNic que seleccionan como diana alfa-ENaC de ser humano y cobaya que no se han seleccionado en los conjuntos previos. Se clasificaron los ARNic restantes del conjunto determinado anteriormente de secuencias de ARNic (sentido) que presentan reacción cruzada entre ser humano-cobaya según las puntuaciones inespecíficas humanas. Se seleccionaron las 63 secuencias superiores (excluyendo secuencias de poli-G), que representan el conjunto sustituto de cobaya *in vivo* (véase la tabla 1d).

Ejemplo 2: Síntesis de ARNic

Síntesis de nucleótidos que comprenden bases naturales

- 50 Puesto que los ARNic de los conjuntos de selección están destinados todos potencialmente para su administración *in vivo*, se sintetizaron ARNic con una estrategia de modificación que protege los ARNic de la degradación por endo

y exonucleasas en un entorno biológico. En esta estrategia, se protegen los extremos 3' de ambas hebras de una actividad 3'->5'-exonucleolítica mediante una unión fosforotioato entre las dos últimas bases nitrogenadas en el extremo 3'. Con el fin de inhibir la degradación endo-nucleolítica del ARNi, se reemplazaron todas las pirimidinas en la hebra sentido del ARNi por el ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo correspondiente. Para reducir el número de modificaciones en la hebra antisentido, que es la hebra más activa y por tanto más sensible a las modificaciones, sólo se modificaron las pirimidinas en el contexto de sitios de escisión de nucleasas principales identificados previamente con grupos 2'-O-metilo. Los sitios de escisión principales son los siguientes dos motivos de secuencia: 5'-UA-3' y 5'-CA-3'.

Puesto que también se ha considerado el uso de ARNi en formulaciones que protegen potencialmente los ARN del entorno biológico nucleolítico en el pulmón, también se sintetizó el mismo conjunto de ARNi sin ninguna protección de la degradación endonucleolítica.

Cuando la fuente de un reactivo no se facilita específicamente en el presente documento, tal reactivo puede obtenerse de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular a una calidad/pureza convencional para su aplicación en biología molecular.

Se produjeron ARN monocatenarios mediante síntesis en fase sólida en una escala de 1 µmol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contiene nucleótidos de 2'-O-metilo mediante síntesis en fase sólida empleando las correspondientes fosforamiditas y fosforamiditas de 2'-O-metilo, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Se incorporaron estos bloques de construcción en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena oligorribonucleotídica usando química de fosforamiditas de nucleósidos convencional tal como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU. Se introdujeron uniones fosforotioato mediante reemplazo de la disolución de oxidante de yodo con una disolución del reactivo Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, RU) en acetonitrilo (1%). Se obtuvieron reactivos auxiliares adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

Se llevó a cabo la desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos brutos mediante HPLC de intercambio aniónico según procedimientos establecidos. Se determinaron los rendimientos y las concentraciones mediante absorción UV de una disolución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se generó ARN bicatenario mezclando una disolución equimolar de hebras complementarias en tampón de apareamiento (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85 - 90°C durante 3 minutos y se enfrió hasta temperatura ambiente a lo largo de un periodo de 3 - 4 horas. Se diluyó la disolución de ARN apareado hasta una concentración de 50 µmol de ARN bicatenario/l y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 3: Pruebas de ARNi *in vitro*

Se sometió a prueba la capacidad de los agentes de ARNi para inhibir expresión de alfa-ENaC en líneas celulares humanas *in vitro*, o en ratas *in vivo*. Se transfecta el agente de ARNi en las células, por ejemplo, mediante transfección, se deja actuar sobre las células durante un determinado tiempo, por ejemplo, 24 horas, y se determinaron los niveles de ARNm de alfa-ENaC mediante análisis de ADN ramificado. Alternativamente, se administra el agente de ARNi *in vivo* a través de vía intratraqueal y se determina la inhibición de la expresión de ARNm de alfa-ENaC mediante análisis de ADN ramificado en el órgano diana. Complementando estos ensayos directos, se sometió a prueba la inhibición de la expresión génica diana mediante agentes de iARN para ARNm de alfa-ENaC expresado de manera recombinante en células huésped de mamífero.

Líneas celulares

Se obtuvieron células H441 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de la ATCC: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania) y se hicieron crecer en RPMI 1640, suero de ternero fetal al 10%, 100 u de penicilina/estreptomycin 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y piruvato de sodio 1 mM (todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania) a 37°C bajo una atmósfera del 5% de CO₂/95% de aire.

Se obtuvieron células epiteliales bronquiales humanas primarias de Cambrex (n.º de cat. CC-2540) y se hicieron crecer rutinariamente en medio BEGM con SingleQuots (n.º de cat. de Cambrex CC-3170 menos tri-yodotreonina). Para la polarización y el crecimiento en la superficie de contacto aire-líquido, se hicieron crecer las células en una mezcla 1:1 de BEGM:DMEM complementada con D-glucosa 4,5 g/l (n.º de cat. de Gibco BRL 41965-039) y complementada con SingleQuots (n.º de cat. de Cambrex CC-4175), como anteriormente pero menos la tri-yodotreonina y alícuotas de GA1000 y en presencia de gentamicina 50 µg/ml (n.º de cat. de Gibco Brl 10131-015). Como las células se mantuvieron en medio libre de suero, se usó disolución de neutralización de tripsina durante las etapas de pase (n.º de cat. de Cambrex CC-5002). Para la polarización y el cultivo en la superficie de contacto aire-

líquido, se hicieron crecer las células sobre soportes de policarbonato semipermeables (0,4 micrómetros) (n.º de cat. de Corning Costar 3407 n.º 3460) y se cultivaron todo el tiempo a 37°C bajo una atmósfera del 5% de CO₂/95% de aire.

5 Se hicieron crecer células de riñón de mono verde africano Cos-1 (n.º de la ATCC CRL-1650) en MEM de Dulbecco, glucosa 4,5 g/L, suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l (Gibco BRL), 100 u de penicilina/estreptomina 100 µg/ml.

Ejemplo 3.1: Selección *in vitro* de ARNic de alfa-ENaC activos y determinación de CI50 en H441

10 Un día antes de la transfección, se indujo la expresión de proteína ENaC-alfa en células H441 (número de la ATCC: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania) añadiendo 100 nM de dexametasona. Directamente antes de la transfección, se sembraron las células a 1,5 x 10⁴ células / pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) en 75 µl de medio de crecimiento (RPMI 1640, suero de ternero fetal al 10%, 100 u de penicilina / estreptomina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y piruvato de sodio 1 mM, todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania). Se realizaron las transfecciones por cuadruplicado. Para cada pocillo, se mezclaron 15 0,5 µL de Lipofectamine2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) con 12 µL de Opti-MEM (Invitrogen) y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente. Para que la concentración de ARNic sea de 50 nM en el volumen de transfección de 100 µl, se mezcló 1 µl de un ARNic 5 µM con 11,5 µl de Opti-MEM por pocillo, se combinaron con la mezcla de Lipofectamine2000-Opti-MEM y se incubaron de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se aplicaron completamente los complejos de ARNic-Lipofectamine2000 (25 µl cada uno por pocillo) a las células y se incubaron las células durante 24 h a 37°C y un 5% de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau). 20

Se recogieron las células aplicando 50 µl de mezcla de lisis (contenido del kit de ADNb QuantiGene de Genospectra, Fremont, EE.UU.) a cada pocillo que contiene 100 µl de medio de crecimiento y se lisaron a 53°C durante 30 min. Después de eso, se incubaron 50 µl de los lisados con conjuntos de sondas específicas para ENaC-alfa humana y GAPDH humana (véase la secuencia de los conjuntos de sondas a continuación) y se procedió según el protocolo del fabricante para QuantiGene. Al final, se midió la quimioluminiscencia en un instrumento Victor2-Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como URL (unidades relativas de luz) y se normalizaron los valores obtenidos con el conjunto de sondas de hENaC con respecto a los valores de GAPDH respectivos para cada pocillo. Se relacionaron los valores obtenidos con ARNic dirigidos contra ENaC-alfa con el valor obtenido con un ARNic no específico (dirigido contra VHC) que se fijó al 100%. Se muestra en las tablas 1A-1D la expresión residual en porcentaje de 25 alfa-ENaC para ejemplos de ARNic. 30

Se caracterizaron adicionalmente ARNic eficaces a partir de la selección mediante curvas de respuesta a la dosis. Se realizaron transfecciones de curvas de respuesta a la dosis a las siguientes concentraciones: 100 nM, 16,7 nM, 2,8 nM, 0,46 nM, 77 pM, 12,8 pM, 2,1 pM, 0,35 pM, 59,5 fM, 9,9 fM y simulado (sin ARNic) y se diluyeron con Opti-MEM hasta una concentración final de 12,5 µl según el protocolo anterior. Se realizó el análisis de datos usando el software incorporado en Microsoft Excel XL-fit 4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, RU) y aplicando número de 35 modelo sigmoideo 606.

Conjuntos de sondas

Alfa-ENaC humano:

Nombre de FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
				:
hENAC00	.235.255.CE	CE	gtctgtccagggttccttccTTTTTctcttgaaagaagt	1645
1				
hENAC00	.274.293.CE	CE	actgccattcttggtgcagtTTTTTctcttgaaagaagt	1646
2				

ES 2 432 157 T3

(continuación)

Nombre de FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
hENAC00 3	.344.367.CE	CE	ctctcctggaagcaggagtgataTTTTTctctggaaagaaagt	1647
hENAC00 4	.391.411.CE	CE	gccgcggatagaagatgtaggTTTTTctctggaaagaaagt	1648
hENAC00 5	.501.521.CE	CE	gcacttggtgaaacagcccagTTTTTctctggaaagaaagt	1649
hENAC00 6	.539.560.CE	CE	agcagagagctgtagctggcTTTTTctctggaaagaaagt	1650
hENAC00 7	.256.273.LE	LE	cgccataatgcccccaaTTTTTtaggcataggaccctgtct	1651
hENAC00 8	.368.390.LE	LE	cacagccacactccttgatcatgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1652
hENAC00 9	.412.431.LE	LE	acagtactccacgttctgggTTTTTtaggcataggaccctgtct	1653
hENAC01 0	.455.477.LE	LE	ggagcttatagtagcagtaccccTTTTTtaggcataggaccctgtct	1654
hENAC01 1	.522.538.LE	LE	acgctgcatggctccgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1655
hENAC01 2	.561.580.LE	LE	gagggccatcgtgagtaaccTTTTTtaggcataggaccctgtct	1656
hENAC01 3	.214.234.BL	BL	Tcatgctgatggaggtctcca	1657
hENAC01 4	.294.318.BL	BL	Ggtaaaggttctcaacaggaacatc	1658
hENAC01 5	.319.343.BL	BL	Cacacctgctgtgtacttgaag	1659

ES 2 432 157 T3

(continuación)

Nombre de FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
hENAC01	.432.454.BL	BL	Caggaactgtgcttctgtagtc	1660
6				
hENAC01	.478.500.BL	BL	Gtggctgaggagaagtcaacct	1661
7				
hENAC01	.581.599.BL	BL	Ccattcctgggatgcacc	1662
8				

GAPDH humana:

Nombre de FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
				:
hGAP001	AF261085.25 2.271.C	CE	gaattgccatgggtggaatTTTTTctctggaagaaagt	1663
	E			
hGAP002	AF261085.33 3.352.C	CE	ggagggatctcgctcctggaTTTTTctctggaagaaagt	1664
	E			
hGAP003	AF261085.41 3.431.C	CE	ccccagccttccatggtTTTTTctctggaagaaagt	1665
	E			
hGAP004	AF261085.43 2.450.C	CE	gctccccctgcaaatgagTTTTTctctggaagaaagt	1666
	E			
hGAP005	AF261085.27 2.289.LE	LE	agccttgacggtgccatgTTTTTaggcataggaccgtgtct	1667
hGAP006	AF261085.29 0.310.LE	LE	gatgacaagctcccgttctTTTTTaggcataggaccgtgtct	1668
hGAP007	AF261085.31 1.332.LE	LE	agatggtgatggattccattTTTTTaggcataggaccgtgtct	1669
hGAP008	AF261085.35 3.372.LE	LE	gcatgccccactgatttTTTTTaggcataggaccgtgtct	1670
hGAP009	AF261085.37 3.391.LE	LE	cacgacgtactcagcgccaTTTTTaggcataggaccgtgtct	1671

(continuación)

Nombre de FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
hGAP010	AF261085.45 1.472.LE	LE	ggcagagatgatgaccctttgTTTTtaggcataggaccctgtct	1672
hGAP011	AF261085.39 2.412.BL	BL	Ggtgaagacgccagtggactc	1673

Se muestran las CI50 para ejemplos de ARNic en las tablas 2A y 2B.

Ejemplo 3.2: Inactivación de alfa-ENaC transitoria en un modelo epitelial bronquial humano primario:

5 Se sembraron en placa células epiteliales bronquiales humanas (referencia del donador 4F1499) en placas de 24 pocillos a 1×10^5 células por pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento un día antes de la transfección. Las células tenían una confluencia del 70% en el día de la transfección con ARNic.

10 Se resuspendió cada ARNic a 100 nM en 1 ml de Optimem I (Invitrogen) y en un tubo separado, se diluyó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) hasta 6 μ l/ml en Optimem, dando una cantidad suficiente para la transfección de cuatro duplicados en una placa de 24 pocillos. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se combinaron las mezclas dando la concentración final deseada de ARNic 50 nM y Lipofectamine 2000 3 μ l/ml. Se incubó la mezcla de transfección durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente y se añadieron 420 μ l del complejo de ARNic/reactivo a cada pocillo tal como dicta el diseño experimental. Se sacudieron las placas suavemente para garantizar un mezclado completo y entonces se incubaron a 37°C en un incubador al 5% de CO₂/95% de aire durante 4 horas. Posteriormente, se aspiró la mezcla de transfección y se devolvieron las células a condiciones de cultivo normales durante 20 horas adicionales.

20 Se prepararon lisados celulares para el análisis de ADN ramificado. Se preparó una mezcla de medio:tampón de lisis 2:1 (Panomics) y se lisaron las células en 200 μ l a 53°C durante 30 minutos. Tras una comprobación visual de que la lisis era completa, se almacenaron los lisados celulares a -80°C para su análisis posterior. Se realizó el análisis de ADN ramificado tal como se describió anteriormente, con la expresión de alfa-ENaC normalizada frente a GAPDH. El protocolo de análisis de ADN ramificado difiere del anterior sólo en que se aplicaron 20 μ l de muestra a cada pocillo en este caso.

La tabla 2C muestra la expresión de alfa-ENaC en HBEC primarias para ejemplos de ARNic.

25 **Ejemplo 3.3: Inhibición *in vitro* de la expresión génica de alfa-ENaC de macaco clonada expresada de manera exógena para agentes de iARN seleccionados en células Cos-1**

Clonación de la secuencia de alfa-ENaC de macaco

Secuencias de cebadores para la amplificación de UTR en 5' y CDS (los nucleótidos mostrados entre paréntesis corresponden a la secuencia de ADNc de α -ENaC de *Macaca mulatta* (mono rhesus)):

P745: 5'-CTCCATGTTCTGCGGCCGCGGATAGAAG-3' (nt 1427) (SEQ.I.D.NO:1674)

30 P733: 5'-CCGCGCCGGCGGGCGGGCT-3' (nt 1) (SEQ.I.D.NO:1675)

P734: 5-CTCCCCAGCCCGGCCGCT-3' (nt 17) (SEQ.I.D.NO:1676)

P735: 5'-GGCCGCTGCACCTGTAGGG-3' (nt 28) (SEQ.I.D.NO:1677)

Secuencias de cebadores para la amplificación de CDS y UTR en 3':

P737: 5'-ATGGAGTACTGTGACTACAGG-3' (nt 1422) (SEQ.I.D.NO:1678)

35 P740: 5'-TTGAGCATCTGCCTACTTG-3' (nt 3113) (SEQ.I.D.NO:1679)

Secuencias de cebadores para la amplificación de la parte interna de CDS:

P713: 5'-5'-ATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGG-3' (nt 1182) (SEQ.I.D.NO:1679)

P715: 5'-5'-TCAGGGCCCCCCCAGAGG-3' (nt 2108) (SEQ.I.D.NO:1680)

5 Se adquirió ARN total de pulmón de macaco (*Macaca fascicularis*) (n.º R1534152-Cy-BC) de BioCat (Alemania). Se realizó la síntesis de ADNc usando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript III (Invitrogen). Se realizó la síntesis del ADNc usando o bien hexámeros al azar o bien cebadores de oligo dT. Además, también se adquirió ADNc de primera hebra de pulmón de macaco de BioCat (n.º C1534160-Cy-BC). Para la amplificación por PCR, se usó el kit de PCR Advantage 2 (n.º K1910-1, Clontech). Se realizó la amplificación de la UTR en 5' y las partes de la CDS usando P745 y una mezcla equimolar de P733, P734 y P735. Para la amplificación por PCR de la CDS y UTR en 3', se usaron los cebadores P737 y P740. Se usaron los cebadores P713 y P715 para la amplificación de partes de la CDS.

10 Se analizaron todos los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y entonces se clonaron en el vector pCR2.1 usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) en bacterias TOP10. Entonces se recogieron los clones y se aisló el ADN usando el kit Qiagen Miniprep. Tras la digestión con enzimas de restricción con *EcoRI* y el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, se sometió el ADN de los clones correctos a secuenciación.

15 Entonces se alinearon las secuencias con la secuencia de ADNc de α -ENaC de mono rhesus, y se alinearon las secuencias de los clones individuales entre sí. Entonces se clonó el ADNc de alfa-ENaC de macaco de longitud completa mediante digestión de la parte en 5' (UTR en 5' y CDS, clon 55) con *EcoRI* y *NotI*, digestión de la parte media de la CDS mediante *NotI* y *BstEII* (clon 15) y la parte en 3' (CDS y UTR en 3') mediante *BstEII* y *EcoRV* (clon 80). Entonces se subclonaron los fragmentos de ADN digeridos en pcDNA3.1, se digirió con *EcoRI* y *EcoRV*.
20 Entonces se sometió el ADNc de alfa-ENaC de macaco de longitud completa en pcDNA3.1 a secuenciación de longitud completa (Ingenetix, Viena, Austria). La secuencia de ADNc de alfa-ENaC de macaco corresponde a los nt 28 - 3113 de la secuencia de ADNc de alfa-ENaC de mono rhesus. Finalmente, se cortó entonces el ADNc de alfa-ENaC de macaco de pcDNA3.1-alfa-ENaC de macaco mediante digestión con *BamHI* y *EcoRV* y se subclonó en el vector pXOON. Se ilustra el mapa del plásmido en la figura 1. La figura 2 representa la secuencia de proteína (SEQ.I.D.NO:1681) y ADN (SEQ.I.D.NO:1682) de alfa-ENaC de macaco.

Transfecciones:

30 Se sembraron células COS-1 a 6×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos cada una en 0,5 ml de medio de crecimiento. Un día tras la siembra, se cotransfectaron las células con el plásmido de expresión de alfa-ENaC de macaco pXOON y el ARNc indicado. Para cada pocillo, se cotransfectaron 4 ng del plásmido de expresión de alfa-ENaC y 600 ng de plásmido portador (pNFAT-luc) con el ARNc relevante (concentración final de 45 nM) usando el reactivo de transfección génica X-treme (Roche) a 3,75 μ l/pocillo en un volumen total de Opti-MEM 720 μ l/pocillo (Invitrogen) tal como se describe a continuación.

35 Se realizaron las transfecciones por triplicado para cada muestra. Se prepararon mezclas madre de plásmido/ARNc (cada una para 3,5 pocillos) tal como sigue: 14 ng de plásmido de expresión de alfa-ENaC, 2,1 μ g de plásmido portador y 112 pmol de ARNc relevante en un volumen total de 210 μ l (Opti-MEM). Se preparó una mezcla madre de lípidos para la transfección completa (105 μ l de lípido más 1575 μ l de Opti-MEM para ocho muestras de transfección por triplicado). Se mezclaron el plásmido/ARNc y el lípido en un volumen igual para dar un volumen total de 420 μ l de mezcla de transfección por muestra por triplicado (3,5x). Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 120 μ l de la mezcla de transfección relevante a cada pocillo de células en un volumen de transfección final de 720 μ l (Opti-MEM).
40 Se transfectaron las células durante 24 horas a 37°C y un 5% de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania) y se recogieron para el análisis de ADN ramificado.

45 Se prepararon lisados celulares para el análisis de ADN ramificado. Se preparó una mezcla de medio:tampón de lisis 2:1 (Panomics) y se lisaron las células en 200 μ l a 53°C durante 30 minutos. Tras una comprobación visual de que la lisis era completa, se almacenaron los lisados celulares a -80°C para su análisis posterior. Se realizó el análisis de ADN ramificado tal como se describió anteriormente, con la expresión de alfa-ENaC de macaco normalizada frente a eGFP a partir del plásmido de expresión. El protocolo de análisis de ADN ramificado usado difiere del anterior sólo en que se aplicaron 20 μ l de muestra a cada pocillo en este caso.

Conjuntos de sondas:

50

ES 2 432 157 T3

Alfa-ENaC de macaco:

Nombre de FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
			:
cyENa001	CE	cgccgtgggctgctgggTTTTTctcttgaaagaaagt	1683
cyENa002	CE	ggtaggagcgggtggaactcTTTTTctcttgaaagaaagt	1684
cyENa003	CE	cagaagaactcgaagagctctcTTTTTctcttgaaagaaagt	1685
cyENa004	CE	cccagaaggccgctctcatTTTTTctcttgaaagaaagt	1686
cyENa005	LE	ggtgcagagccagagcactgTTTTTctcttgaaagaaagt	1687
cyENa006	LE	gtgccgcaggttctgggTTTTTtagcataggaccctgtct	1688
cyENa007	LE	gatcagggcctcctcctcTTTTTtagcataggaccctgtct	1689
cyENa008	LE	ccgtggatggtgtattgtgTTTTTtagcataggaccctgtct	1690
cyENa009	LE	gcggttgtgctgggagcTTTTTtagcataggaccctgtct	1691
cyENa0010	LE	ttgccagtacatcatgcaaaaTTTTTtagcataggaccctgtct	1692
cyENa0011	BL	acaccaggcggatggcg	1693

eGFP:

Nombre de FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
			:
EGFP001	CE	ggcacgggcagcttgTTTTTctcttgaaagaaagt	1694
EGFP002	CE	ggtagcggctgaagcactgTTTTTctcttgaaagaaagt	1695
EGFP003	CE	cctggacgtagcctcgggTTTTTctcttgaaagaaagt	1696
EGFP004	CE	cctgaagaagatggtgcgctTTTTTctcttgaaagaaagt	1697
EGFP005	LE	cgaactcacctcggcgcTTTTTctcttgaaagaaagt	1698
EGFP006	LE	ccttcagctcgatcggtTTTTTctcttgaaagaaagt	1699
EGFP007	LE	gtcacgagggtggccagTTTTTtagcataggaccctgtct	1700
EGFP008	LE	cacgccgtaggtcaggggtTTTTTtagcataggaccctgtct	1701
EGFP009	LE	gtgctgctcatgtggtcggTTTTTtagcataggaccctgtct	1702
EGFP0010	LE	tcaccagggtgtgcctTTTTTtagcataggaccctgtct	1703
EGFP0011	BL	cggtggtgcagatgaactca	1704

(continuación)

Nombre de FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO
EGFP0012	BL	catggcggactgaagaagtc	1705
EGFP0013	BL	cgtcctccttgaagtcgatgc	1706

La tabla 2C muestra la expresión de alfa-ENaC en la especie macaco para ejemplos de ARNic.

Ejemplo 3.4 Selección para la inducción de interferón-α

- 5 Para evaluar la capacidad de ARNic para estimular la liberación de interferón-a (IFNα), se incubó ARNic con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién purificadas *in vitro* durante 24 horas. Se añadió el ARNic o bien directamente a las PBMC, o bien tras complejarse con un agente de transfección lipídico (agente de transfección GenePorter 2 o Lipofectamine 2000 o DOTAP) y se incubó posteriormente con las PBMC. Como controles positivos para la inducción de IFNα, se incluyeron las secuencias control no modificadas D_I_A2216 y D_I_A5167.
- 10 DI_A_2216: es una molécula de ADN antisentido monocatenario
 5'-dGsdGsdGdGdGdAdCdGdAdTdCdGdTdCdGsdGsdGsdGsdGsdG-3'
 (SEQ.I.D.NO:1707)
 DI_A_5167 es un ARNic conjugado con colesterol
 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-s-col-3'
- 15 3'-CsAsCAGUAGUGUGACUUAUGGUUA-5' (SEQ.I.D.NO:1708)
- Tras 24 horas, se midió el IFNα mediante ELISA. Se determinó el nivel de IFNα basal para células no tratadas y era siempre muy próximo a un control de sólo agua. La adición del agente de transfección solo no dio ningún aumento o dio un pequeño aumento de los niveles de IFNα. Se añadieron oligonucleótidos estimuladores conocidos a las células, o bien directamente o bien en presencia de transfectante, y se observaron los aumentos esperados de IFNα.
- 20 Este sistema permite determinar la estimulación de IFNα en PBMC humanas por ARNic (u otros oligonucleótidos).
- Aislamiento de PBMC humanas: Se obtuvo una fracción concentrada de leucocitos (capa leucocítica) del Blood Bank Suhl, Institute for Transfusion Medicine, Alemania. Estas células eran negativas para una variedad de patógenos, incluyendo VIH, VHC y otros. Se diluyó la capa leucocítica 1:1 con PBS, se añadió a un tubo que contenía Ficoll y se centrifugó durante 20 minutos a 2200 rpm para permitir el fraccionamiento. A esto le siguió la eliminación de la capa turbia de los glóbulos blancos y se transfirió a un tubo con PBS nuevo y Ficoll, que se centrifugó durante 15 minutos a 2200 rpm. Se eliminó de nuevo la capa turbia de glóbulos blancos, se transfirió a medio de cultivo RPMI 1640 y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm para sedimentar los glóbulos blancos. Se resuspendieron las células en RPMI, se sedimentaron como anteriormente y se resuspendieron en medio con FCS 10% hasta 1×10^6 /ml.
- 25
- Medición de interferón-α: Se combinaron las células en cultivo con o bien oligonucleótido 500 nM (o 1 μM) en Optimem o bien oligonucleótido 133 nM en agente de transfección GP2 o Lipofectamine2000 o DOTAP durante 24 horas a 37°C. Se midió el interferón-α con el kit de ELISA instantáneo de Bender Med Systems (Viena, Austria) según las instrucciones del fabricante.
- 30
- Se basó la selección de las secuencias terapéuticas líder en un nivel de inducción de IFNα de menos del 15% del control positivo.
- 35 **Ejemplo 3.5 Determinación de la estabilidad del ARNic en esputo de pacientes con CF**
- Se recogieron muestras de esputos por el Dr. Ahmet Uluer, Children's Hospital Boston. Tras la recogida, se trataron las muestras de esputos con antibiótico y se irradiaron con UV para reducir el contenido bacteriano. Para determinar la estabilidad del ARNic en muestras de esputos, se incubaron los ARNic en 30 μl de esputo a una concentración de 5 μM a 37°C durante los tiempos indicados. Se terminó la reacción mediante la adición de proteinasa K y se incubaron las muestras a 42°C durante otros 20 minutos. Se añadió una molécula de ARN de 40 meros compuesta
- 40

por L-nucleótidos ("Spiegelmer") resistente a la degradación por nucleasas y sirvió como patrón de calibración. Se filtraron las muestras a través de una membrana de 0,2 µm para eliminar los residuos restantes. Se analizaron las muestras mediante HPLC de intercambio iónico desnaturante sobre una columna DNAPac PA 200 (Dionex) a pH 11,0 usando un gradiente de perclorato de sodio para la elución. Se cuantificaron ARNic y productos de degradación mediante la determinación del área bajo el pico para cada muestra. Se normalizó la concentración con respecto a la concentración en las muestras no incubadas.

Se basó la selección de las secuencias terapéuticas líder (ND8356, ND8357 y ND8396) en una estabilidad *in vitro* observada en esputo de CF con una semivida mayor de 60 minutos.

Ejemplo 3.6 Comprobación cruzada de las secuencias terapéuticas líder frente a polimorfismos conocidos en el gen SCNN1A humano

Para excluir polimorfismos conocidos de los sitios diana de candidatos líder, se comprobaron las secuencias de ARNic líder frente a la base de datos de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp>). De los 10 polimorfismos de exones conocidos en el gen SCNN1A humano, ninguno mostró estar presente en los sitios diana de cualquiera de los 10 candidatos terapéuticos líder más potentes.

Ejemplo 3.7: Obtención del perfil *in vitro* de las 5 secuencias inespecíficas pronosticadas superiores

Se clasificó una lista de alineaciones para cada secuencia mediante su homología a lo largo de una región de 19 meros. Se puntuaron las dianas inespecíficas basándose en el número y la posición de los apareamientos erróneos según los criterios descritos en el ejemplo 1. Se identificaron las 5 secuencias inespecíficas superiores para cada secuencia terapéutica líder (ND8356, ND8357 y ND8396). Se clonaron individualmente secuencias específicas e inespecíficas en un sistema de indicador de luciferasa doble. Cada fragmento clonado abarcaba los 19 nucleótidos diana además de 10 nucleótidos que flanqueaban la región, tanto en 5' como en 3' de la secuencia diana. Se clonaron los fragmentos en un sitio de clonación múltiple en 3' con respecto a la secuencia de luciferasa de *Renilla*, bajo el control de un promotor de SV40. Se determinó la actividad de cada ARNic frente a secuencias tanto específicas como inespecíficas mediante la fluorescencia relativa de la luciferasa de *Renilla* diana con respecto a la luciferasa de luciérnaga, estando esta última controlada independientemente por el promotor de TK de VHS. Inicialmente, se realizaron las transfecciones en células COS-7 a una concentración de ARNic de 50 nM. Se tomaron lecturas de luciferasas a las 24 h tras la transfección. A esta alta concentración de ARNic, no se observó inactivación de más del 30% frente a cualquier secuencia inespecífica para cualquiera de los tres ARNic líder. Se demostró actividad frente a la secuencia específica con una reducción relativa en la actividad de luciferasa de *Renilla* de aproximadamente el 80%. También se generaron curvas de CI50 para cada ARNic frente a la secuencia específica y se controlaron con las secuencias inespecíficas identificadas anteriormente. Para cada ARNic líder, las CI50 específicas en este ensayo de indicador eran de un orden de magnitud similar (10-50 pM) a las CI50 obtenidas frente a la diana endógena en H441 (ejemplo 3.3), lo que indica que para ND8356, ND8357 y ND8396, la potencia frente a la secuencia específica era al menos 1000-5000 veces superior que para cualquiera de las secuencias inespecíficas pronosticadas.

Ejemplo 3.8: Obtención del perfil de genotoxicidad

1. Determinación de la citotoxicidad: Se determinó la citotoxicidad usando un contador de células para la evaluación de número de células en cultivo.

2. Se sabe bien que las pruebas de las concentraciones citotóxicas *in vitro* pueden inducir efectos genotóxicos tales como formación de micronúcleos. Por tanto, se consideró que el aumento de los números de células que contenían micronúcleos que aparecen en los recuentos celulares de aproximadamente el 50% o menos (en comparación con el control negativo simultáneo) estaba relacionado con la citotoxicidad si no podía observarse todavía un aumento dependiente de la dosis en las células micronucleadas a concentraciones que muestran toxicidad moderada como máximo. Se requiere el análisis de una concentración que muestra al menos un 50% de reducción en el recuento celular por las directrices que regulan los ensayos de células de mamíferos *in vitro* (directrices de OECD e ICH para la realización de pruebas de aberraciones cromosómicas). Además, los protocolos de OECD requieren que las pruebas de compuestos no tóxicos incluyan al menos una concentración de precipitación (siempre que esta no exceda de 10 mM o 5 mg/ml, cualquiera que sea inferior). Puesto que la prueba de micronúcleos *in vitro* tiene como objetivo predecir el desenlace de los ensayos regulatorios, es decir, la prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro*, se diseñó el protocolo para la prueba de micronúcleos *in vitro* para que cumpliera los requisitos de estas pruebas.

3. Sistema de prueba: Las células TK6 son células inmortalizadas y transfectadas con virus de Epstein-Barr (origen linfoblastoide humano derivadas del bazo). Determinación del potencial clastogénico y/o aneugénico en la prueba de micronúcleos *in vitro* con células TK6 con/sin homogeneizado de hígado S9 (2%) de ratas macho (tratadas

previamente con Aroclor 1254). Tiempo de tratamiento: 20 h (-S9), 3 h (+S9). Tiempo de toma de muestras: 24 h tras el inicio del tratamiento de 3 horas, 48 h tras el inicio del tratamiento de 20 horas. Para cada sustancia, se analizaron al menos tres concentraciones (2 cultivos por concentración) y 2000 células por concentración.

5 4. El efecto de inducción de micronúcleos para una concentración sometida a prueba se consideró positivo si la frecuencia de células micronucleadas era

- $\geq 2\%$ y mostró al menos una duplicación del valor del control de disolvente simultáneo, OR

- $< 2\%$ y mostró al menos un aumento de 3 veces con respecto al valor del control de disolvente simultáneo.

5. Para concluir que un experimento es positivo, tienen que tenerse en cuenta la relación dosis-efecto y la toxicidad.

6.

10 7. Resumen: Las secuencias terapéuticas líder ND8396, ND8356, ND8357 no indujeron un aumento del número de células que contenían micronúcleos tras el tratamiento de 20 horas sin activación metabólica, ni tras el tratamiento de 3 horas con o sin S9. No pudo analizarse la concentración citotóxica hasta el límite de prueba de 5 mg/ml.

Ejemplo 3.9 Eficacia funcional *in vitro* en H441: ND8396

15 Con el fin de demostrar la eficacia funcional *in vitro* de ARNic líder frente a alfaENaC, se transfectaron células H441 con ARNic y se prepararon para el análisis mediante la cámara de Ussing del transporte iónico. Para la transfección, se sembraron en placa células H441 en frascos T25 a 2×10^6 células por frasco en medio de cultivo complementado con dexametasona 200 nM. Se transfectaron las células en cada frasco con o bien ND8396 o bien un ARNic control que no seleccionaba como diana a ARNic 30 nM y Lipofectamine 2000 4 ml/ml en un volumen total de 5 ml (medio libre de suero). Un día tras la transfección, se sembraron en placa las células sobre insertos Snapwell de 1 cm^2 a

20 confluencia (2×10^5 células por inserto) para minimizar el tiempo requerido para la diferenciación y formación de uniones estancas y se suministró medio en las cámaras tanto apical como basolateral. Tras un día de cultivo adicional, se eliminó el medio apical y se reemplazó el medio basolateral, llevando así las células a cultivo en la superficie de contacto aire-líquido (ALI). Se mantuvieron las células en ALI durante seis días adicionales antes del análisis del transporte iónico.

25 8. Para el análisis funcional en cámaras de Ussing, se montaron los insertos de Snapwell en cámaras de difusión vertical (Costar) y se bañaron con disolución de Ringer gasificada de manera continua (el 5% de CO_2 en O_2 ; pH 7,4) mantenida a 37°C que contiene: NaCl 120 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 3,3 mM, K_2HPO_4 0,8 mM, CaCl_2 1,2 mM, MgCl_2 1,2mM y glucosa 10 mM. Se determinó la osmolaridad de la disolución dentro del intervalo de 280 y

30 300 mosmol/kg de H_2O . Se sometieron las células a pinzamiento de voltaje a 0 mV (modelo EVC4000; WPI). Se midió la resistencia transepitelial (R_T) aplicando un pulso de 1 ó 2 mV a intervalos de 30 s, o usando la diferencia de potencial inicial a través de las células y la corriente inicial medida, y calculando entonces R_T mediante la ley de Ohm. Se registraron los datos usando una estación de trabajo PowerLab (ADInstruments). Tras el tratamiento con ARNic, se registraron las características basales de las células y la corriente de cortocircuito sensible a amilorida (I_{sc} tras la aplicación de amilorida 10 μM ; lado apical sólo). Se determinó la actividad del canal ENaC en cada cultivo

35 mediante la I_{sc} sensible a amilorida en cada caso.

9. Tras el ensayo, se lisaron las células en los insertos individuales para el análisis del ARN. Se correlacionó una inactivación del 75% al nivel del ARN en el tiempo de ensayo (ND8396 en comparación con control que no selecciona como diana) con una inactivación funcional de la corriente sensible a amilorida de aproximadamente el 30% (ND8396 en comparación con control que no selecciona como diana).

40 Se representan a continuación secuencias de ácido nucleico usando nomenclatura convencional, y específicamente las abreviaturas de la tabla A.

Tabla A: Abreviaturas de monómeros de nucleótido usados en la representación de secuencias de ácido nucleico. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presente en un oligonucleótido, se unen mutuamente mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

45

Abreviatura ^a	Nucleótido(s)
A	adenosina-5'-fosfato
C	citidina-5'-fosfato
G	guanosina-5'-fosfato
T	2'-desoxi-timidina-5'-fosfato
U	uridina-5'-fosfato
c	2'-O-metilcitidina-5'-fosfato
u	2'-O-metiluridina-5'-fosfato
Ts	2'-desoxi-timidina-5'-fosforotioato

Tabla 1A: ARNi seleccionados en el conjunto de selección inicial (ARNi que presentan reactividad cruzada entre ENaC alfa de ser humano-rhesus). Se identificaron un total de 152 secuencias de ARNi como conjunto de selección inicial, tanto con (hebras de secuencia 1-304) como sin (hebras de secuencia 305-608) modificación de la estructura principal. Se diseñaron secuencias de ARNi para que fuesen completamente complementarias con secuencias de alfa-ENaC de tanto ser humano como mono rhesus, según los criterios de diseño descritos en la sección de ejemplos. Se muestra la expresión residual en porcentaje de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de una única dosis independientes (se hace referencia a la sección de ejemplos para los métodos usados).

5

ID de dúplex	ID de sec.	Sentido	ID de sec.	Antisentido	1° selección de una única dosis a 50 nM en H441; MV	DE	2° selección a 50 nM en H441	DE
ND8285	1	AGcccGUAGcGuGGccuccTsT	2	GGAGGcCACCCUACGGCCUtsT	92%	4%	114%	15%
ND8286	3	ccGGGuAAuGGGuGcAcGGTsT	4	CCCGUGcACcAUuACCcGGTsT	60%	1%	84%	4%
ND8287	5	AuGcUuAcCgGAcAGAAcTsT	6	UGUUCUGUCGGAUAGcAUtsT	27%	2%	35%	3%
ND8288	7	uGcuAucGcGAcAGAAcAAtsT	8	UUUUCUUGUCGGAuAGcATsT	23%	1%	32%	4%
ND8289	9	GcccGuuuAuGuAuGcuccTsT	10	GGAGcAUAcAAcAAcGGcTsT	64%	2%	93%	8%
ND8290	11	GcccGuAGcGuGGccuccATsT	12	UGGAGCCcACGcUACGGcTsT	83%	2%	115%	5%
ND8291	13	ccGGAAuuAAAAGAGGAGcTsT	14	GCUCcUUUUAAUUUCcGGTsT	54%	2%	79%	10%
ND8292	15	ccGAAGGuuccGAAGccGATsT	16	UCGGCUUGCGAAcCUUCcGGTsT	40%	1%	54%	8%
ND8293	17	GcAAuucGGccuGcuuuucTsT	18	GAAAGcAGcCGAAUUGcTsT	41%	2%	51%	4%
ND8294	19	GGGAuuuAcucucAcuucTsT	20	GAAUGAGAGuAAUUCcGCTsT	19%	1%	25%	5%
ND8295	21	GcGAuuuAcucucAcuucTsT	22	GGAAGUGAGuAAUUCcGCTsT	19%	5%	20%	1%
ND8296	23	AAccAGGcAAuuuAcucucTsT	24	GAGAGuuuUUGcUUGGUtsT	92%	4%	115%	19%
ND8297	25	GGuAAUGGuGcAcGGcAGTsT	26	CUUGCCcUGcACcAUuACcTsT	79%	2%	104%	14%
ND8298	27	cUcAcGAuGGccucGGUGTsT	28	cACCGAGCCcAUcUGGAGTsT	61%	3%	97%	14%
ND8299	29	GcuccGAAGGuuccGAAGcTsT	30	GCUCcGAAcCUUCcGGAGcTsT	16%	2%	19%	3%
ND8300	31	GccGAuAcuGGucuccAGGtsT	32	CCUGGAGAcAGuAUcCGcTsT	50%	5%	55%	5%
ND8301	33	ccGAuAcuGGucuccAGGtsT	34	GCCUGGAGAcAGuAUcCGcTsT	53%	2%	65%	6%
ND8302	35	uGcuGuuGcAccAuAcuuTsT	36	AAAGuAUUGUcAAcAGcATsT	19%	1%	25%	3%
ND8303	37	AAcGGuuGuuccuGAUGcTsT	38	GcAUcAGGAcAGAcGUtsT	90%	3%	96%	11%
ND8304	39	uuAAcuuGcGGccuGGcGuTsT	40	ACGCCAGCCcAAAGuuAATsT	97%	3%	101%	11%
ND8305	41	GcuGGuuAcucAcGAUGcTsT	42	GcAUcUGAGuAAcAGcTsT	73%	2%	78%	7%

10

ND8306	43	uuAcucAcGauGGccucGTsT	44	CGAGGGCCAUUCGUGAGUAAATsT	91%	7%	93%	6%
ND8307	45	GAAGccGauAcuGGucucGTsT	46	GGAGACCAGUUCGGCUUCTsT	71%	3%	73%	6%
ND8308	47	GAUAcuGGucucAGGccGTsT	48	CGCCUUGGAGACCAGUUCTsT	86%	1%	90%	9%
ND8309	49	AuAcuGGucuccAGGccGTsT	50	UCGGCCUGGAGACCAGUUCTsT	71%	5%	70%	8%
ND8310	51	caAcGGucucGuccuGUGTsT	52	caUCAGGGACAGACCGUUGTsT	80%	2%	84%	9%
ND8311	53	uuuAAcuuGcGGccuGGcGTsT	54	CGCCAGGCCGcAAGUuAAATsT	95%	2%	107%	15%
ND8312	55	uAcucAcGauGGccucGTsT	56	CCGAGGGCCAUUCGUGAGUATsT	44%	2%	97%	9%
ND8313	57	uuucGGAGAGuAcuucAGTsT	58	GCUGAAGUACUCGCCAAATsT	14%	2%	16%	2%
ND8314	59	GcAGAcGcucuuGAccuGTsT	60	cAGGUCAAAGCGGUCUGTsT	55%	4%	58%	5%
ND8315	61	cuAcAucucuaAuccGcGTsT	62	CCCGGAUAGAAGUUGTsT	20%	3%	26%	4%
ND8316	63	AGCcGAAuuAcucAcuucTsT	64	AAGUGAGAGUAAUUCGCUTsT	24%	1%	25%	2%
ND8317	65	ccGcuucAAccAGGucucTsT	66	GGAGACCUCGUUGAAGCGTsT	62%	5%	64%	4%
ND8318	67	caAccGcAuGAAGAGCGTsT	68	GGCCUCUUCUUCGCCGUGTsT	54%	6%	54%	4%
ND8319	69	AuGAAGAcGGccuucGGTsT	70	CCcAGAAGCGCCUCUUAUTsT	44%	4%	44%	6%
ND8320	71	AGCACAaccGcAUGAAGATsT	72	GUCUUAUGCGGUGUGGUTsT	15%	1%	16%	1%
ND8321	73	ucGAGuuccAccGcucuaTsT	74	uAGGAGCGGUGAACUCGATsT	85%	5%	89%	13%
ND8322	75	cuGcuucAaccAGAcuAcTsT	76	GuAUGUCUGGUAAGAAGCGTsT	46%	4%	44%	3%
ND8323	77	GAGGGAGUGuAaccGcuucTsT	78	GAAGCGGUACcACUCCUCTsT	60%	7%	56%	3%
ND8324	79	ccuuuAuGGAuGAUGGUGTsT	80	CcACCcAUCcAUAAGGTsT	83%	9%	82%	1%
ND8325	81	uGAGGGAGUGuAaccGcuucTsT	82	AAGCGGUACcACUCCUCATsT	77%	6%	72%	2%
ND8326	83	cuGcAAccAGGcAAuuATsT	84	uAAUUCGCGUUGcAGTsT	41%	4%	44%	7%
ND8327	85	GGccuGGcGUGGAGAccuTsT	86	GAGGUCUCCAGCCAGGCGTsT	101%	5%	95%	4%
ND8328	87	uGcuuuucGGAGAGuAcuucTsT	88	AAGUACUCUCCGAAAGCATsT	36%	1%	29%	2%
ND8329	89	cccGuAGcGUGccuccAGTsT	90	CUGGAGCCcAGCUCAGGCGTsT	52%	1%	51%	2%
ND8330	91	ccGuAGcGUGccuccAGTsT	92	GCUGGAGCCcAGCUCAGGCGTsT	86%	9%	84%	3%
ND8331	93	ccAGGGAAuuAcucAcTsT	94	GUAGAGGUAAUUCGCGUGTsT	15%	2%	13%	1%
ND8332	95	GAAAcuGcuAuAcuucAAATsT	96	UUGAAAGUAAAGcAGUUCTsT	10%	1%	10%	1%
ND8333	97	GcccGGGAAuGGuGcAcGTsT	98	CGUGcACcAUuACCcGGCGTsT	83%	6%	82%	4%
ND8334	99	cccGGGAAuGGUGcAcGTsT	100	CGGUGCCcAUuACCcGGCGTsT	56%	4%	71%	10%
ND8335	101	cGGGAAuGGUGcAcGGCGTsT	102	GCCCUGcACcAUuACCcGGCGTsT	42%	3%	91%	8%
ND8336	103	GGGAAuGGUGcAcGGCGATsT	104	UGCCCGUGcACcAUuACCcGGCGTsT	65%	5%	71%	7%
ND8337	105	uAAuGGUGcAcGGCGAGTsT	106	UCCUGCCCGUGcACcAUuATsT	46%	3%	46%	4%
ND8338	107	cuGGuuAcucAcGauGGccTsT	108	GGCcAUCGUGAGUAAcAGTsT	74%	5%	79%	10%
ND8339	109	GuuAcucAcGauGGccucTsT	110	GAGGGCCcAUCGUGAGUAAcTsT	85%	6%	92%	8%
ND8340	111	uGucAcGauGGucAccucTsT	112	GAGGGUGAGCcAUCGUGAcATsT	85%	4%	74%	5%
ND8341	113	uGcuccGAAGGuuccGAAGTsT	114	CUUCGGAACCUUCGAGcATsT	37%	2%	32%	3%
ND8342	115	uccGAAGGuuccGAAGccGTsT	116	CGGCUUCGGAACCUUCGGATsT	60%	4%	47%	5%
ND8343	117	uucccGAAGccGauAcuGGuTsT	118	ACcAGuAUCGGCUUCGGAAATsT	15%	1%	13%	2%
ND8344	119	AGccGauAcuGGucuccAGTsT	120	CUGGAGACCAGuAUCGGCUCTsT	49%	3%	41%	3%
ND8345	121	cuuGGuAcuGccucGAAcTsT	122	GUUCAGAGcAGuAACCcAGTsT	55%	2%	47%	4%
ND8346	123	cucccGUAAGcAcAcuAAATsT	124	UuAAuAGUGUGCuACGGGAGTsT	67%	3%	57%	5%
ND8347	125	ucccGUAAGcAcAcuAAcTsT	126	GUuAAuAGUGUGCuACGGGATsT	29%	1%	26%	3%
ND8348	127	uGcAccAuAcuucuuGUAATsT	128	uACAAGAAAGuAUGGUGcATsT	17%	1%	15%	3%
ND8349	129	uuGcccGuuuAuGuAuGcuTsT	130	AGcAuAcuAAACGGGGcAAATsT	68%	2%	50%	4%
ND8350	131	uGcccGuuuAuGuAuGcuTsT	132	GAGcAuAcuAAACGGGGcAAATsT	59%	8%	44%	6%
ND8351	133	GGAcccuAGAccucGcAGTsT	134	CUCAGAGGUCuAGGGUCCTsT	86%	11%	82%	2%
ND8352	135	ccuAGAccucGcAGccATsT	136	UGGGCUGcAGAGGUCuAGGTsT	69%	7%	79%	3%
ND8353	137	uGGcAuGauGcuGGcAAATsT	138	UUGCCAGuAcAUcAUGCCATsT	58%	4%	52%	4%
ND8354	139	uAcuGGcAAuucGGccuGcTsT	140	GcAGGCCGAAUUGCCAGuATsT	101%	4%	100%	4%
ND8355	141	AAuucGGccuGcuuuucGGTsT	142	CCGAAAGcAGGCCGAAUUTsT	49%	1%	43%	6%
ND8356	143	cuGcuuuucGGAGAGuAcuTsT	144	AGuACUCUCGAAAGcAGTsT	17%	3%	18%	1%
ND8357	145	uuCGGAGAGuAcuucAGcuTsT	146	AGCUGAAGuACUCUCCGAAATsT	13%	3%	16%	2%

ND8358	147	AGCAGACGccuuuGAccuTsT	148	AGGUcAAAGAGCGUCUGCUtsT	73%	9%	71%	5%
ND8359	149	cuuGcAGcGccuGAGGGuTsT	150	GACCCUcAGGGCGUGcAAAGTsT	57%	9%	64%	7%
ND8360	151	uGGcuuuAAcuuGcGGccuTsT	152	AGGCCGcAAGUuAAAGCCATsT	102%	12%	106%	10%
ND8361	153	GcuuuAAcuuGcGGccuGGTsT	154	CcAGGCCGcAAGUuAAAGCTsT	83%	5%	82%	8%
ND8362	155	uAAcuuGcGGccuGcGUGTsT	156	cACGGcAGGGCGcAAGUuATsT	119%	2%	115%	6%
ND8363	157	AccuuuAccuuCAAAGuATsT	158	uACUuUAGAGGUAAAGGUtsT	17%	3%	13%	2%
ND8364	159	GGuuAcucAcGAUGGccuTsT	160	AGGGcCAUCUGAGUAACTTsT	104%	9%	117%	17%
ND8365	161	cACGAUGGccuCGGUGATsT	162	GUCACCGAGGGcCAUCGUGTsT	140%	13%	100%	9%
ND8366	163	AGAUcGcAucGcGAcAGAATsT	164	UUCUuAUGCGAUAGCAUCGUsT	46%	2%	70%	6%
ND8367	165	AcGAUGGAcAccuuccuGuTsT	166	AcAGGAGGUGAcCAUCGUsT	85%	6%	128%	10%
ND8368	167	cuccGAAGGuucGGAGGcTsT	168	GGCUUCGGAAcCUUCGGAGTsT	12%	2%	18%	1%
ND8369	169	AAGUuccGAAGcGcGAUAcTsT	170	GUuACGGCUUCGGAAcCUUsT	63%	7%	114%	19%
ND8370	171	GGUuAGcGcucUGAAcAcTsT	172	AGUUGcAGGAGGcAGACCTsT	36%	3%	71%	6%
ND8371	173	AGcuuuGAcAAGGAcuuuTsT	174	AAAGUUCUUGUcAAAGCUtsT	17%	1%	21%	1%
ND8372	175	uuUGAcAAGGAcuuuccuTsT	176	AGGAAAGUUCUUGUcAAATsT	16%	2%	26%	4%
ND8373	177	uGAcAAGGAcuuuccuAATsT	178	UuAGGAAAGUUCUUGUcATsT	12%	1%	22%	5%
ND8374	179	cccGUAGcAcAcUuAAcATsT	180	UGUuAUGUGUcUAGCGGUsT	41%	2%	75%	3%
ND8375	181	cAcuAuAAcAucUcUGGATsT	182	UCCAGcAGAUUcUuAAGUGTsT	17%	1%	26%	2%
ND8376	183	uuGcuUuuGcAccAUAcuuTsT	184	AAGUuUGGUGcAAcAGCAATsT	45%	4%	69%	6%
ND8377	185	GUAcuGGcAAuucGGccuGTsT	186	cAGGCCGAUUCGGAAcUAcTsT	60%	6%	120%	8%
ND8378	187	uuCGGccuGcuuuucGGAGTsT	188	CUCCGAAAGcAGGCCGAAATsT	57%	5%	86%	11%
ND8379	189	ccuGUuuuuCGGAGAGuAcTsT	190	GUACUUCUCCGAAAGcAGGTsT	43%	5%	50%	3%
ND8380	191	GcuuuucGGAGAGuAcuucTsT	192	GAAGUACUUCCGAAAGCTsT	16%	2%	24%	2%
ND8381	193	cuuuucGGAGAGuAcuucATsT	194	UGAAAGUACUUCGAAAGCTsT	12%	1%	16%	3%
ND8382	195	cAAccuAAcucGGAcAAGTsT	196	CUUGCCGAGUUGUAGGUsTsT	33%	2%	39%	3%
ND8383	197	cuAccAGAcAuAcuAcuATsT	198	UGAUAGAGUuUGUUGGUAAGTsT	13%	1%	23%	6%
ND8384	199	cuGucGAGcGcGcAGAcATsT	200	UCUCUGGcAGCCUGcAcAGTsT	11%	1%	18%	3%
ND8385	201	AAAcuGcuAuAcuuucAAuTsT	202	AUDGAAAGUuAGcAGUuUsTsT	48%	8%	64%	11%
ND8386	203	GGcuuuAAcuuGcGGccuGUsTsT	204	cAGGCCGcAAGUuAAAGCTsT	55%	7%	70%	8%
ND8387	205	cuuuuAAcuuGcGGccuGcTsT	206	GCcAGGCCGcAAGUuAAAGTsT	40%	11%	87%	14%
ND8388	207	AGGUgUGuAuucAcuccuGUsTsT	208	cAGGAGUGAAUAcAcACCUsTsT	45%	3%	41%	5%
ND8389	209	AcGAUGGccuCGGUGAcATsT	210	UGUcAACCAGGGcCAUCGUsTsT	43%	2%	60%	9%
ND8390	211	cuGAAcAcucUGGuuuccTsT	212	GGGAAAcAGAGUGUUCAGTsT	33%	2%	48%	11%
ND8391	213	cuAAAcAuAcuGcuGGAGUsTsT	214	ACUCCAGcAGAUUGUuAAAGTsT	16%	1%	17%	4%
ND8392	215	GcAccAUAcuuucuuGUAcTsT	216	GUAcAAGAAAGUuAGGUGCTsT	19%	1%	22%	4%
ND8393	217	uGUcuAGcccAucAuccuGUsTsT	218	cAGGAUGAUUGGCUAGAcATsT	69%	3%	92%	15%
ND8394	219	AGGAcCCuAGAcCuucGcATsT	220	UGcAGAGGUcUAGGGUCCUsTsT	94%	5%	86%	13%
ND8395	221	ccAccGcuucAuccGAGAGTsT	222	CUUCUGGUAGGAGCGGUGGsTsT	55%	1%	65%	6%
ND8396	223	uAccGAGAcCuucGAGUsTsT	224	ACUCGAAAGAGCUUCUGGUAATsT	11%	1%	11%	1%
ND8397	225	AAcAuuccuGucGAGGcGcTsT	226	GcAGCCUCGAcAGGAUUGUsTsT	90%	7%	72%	11%
ND8398	227	GAAccuuuAcccuCAAAGTsT	228	CUUUGAAGGGUAAAGGUUCUsTsT	22%	2%	25%	4%
ND8399	229	GGuuccGAAGccGAuAcuGUsTsT	230	cAGAUUCGGCUUCGAAACCTsT	93%	9%	89%	9%
ND8400	231	AAGccGAuAcuGGucuccATsT	232	UGGAGAcAcGAUcGGCUUsTsT	35%	2%	42%	9%
ND8401	233	ucUAGcccAucAuccuGcuTsT	234	AGcAGGAUGAUUGGCUAGATsT	95%	8%	95%	14%
ND8402	235	cGGcGccAuccGccuGGUGTsT	236	cACcAGGGCGAUUGGGCGGUsTsT	81%	8%	89%	17%
ND8403	237	uuuucGGAGAGuAcuucAGTsT	238	CUGAAAGUACUUCGAAATsT	13%	1%	13%	1%
ND8404	239	GAGAGAcuucAGcAuccTsT	240	GGGUAGCUAGAGUACUCUsTsT	71%	3%	100%	10%
ND8405	241	GAcGcuuuuGAccuGUAcTsT	242	GUAcAGGUAcAAGAGCGUUsTsT	84%	5%	92%	13%
ND8406	243	uGUuAuucAcuuccuGcuTsT	244	AAGcAGGAGUAAuAcAcATsT	78%	2%	89%	8%
ND8407	245	AAcAAcAAGAGAAuGGAGTsT	246	CUCCAUUCUCUUGUUGUsTsT	66%	3%	88%	21%
ND8408	247	AuUGAAGGAUGUGcAGGGcTsT	248	GCcCUGcAcAUCCUUcAAUsTsT	25%	1%	36%	6%
ND8409	249	ucucAGAcGccGcccAAAcuTsT	250	AGUuUGGGCGCCUCUGAGATsT	18%	1%	24%	2%

ND8410	251	AAAcACAACcAAGGGUACATsT	252	UGuACCCUUGGUUGUUGUUsT	21%	1%	35%	2%
ND8411	253	uAcCCcGuGcccuAcAGAGTsT	254	CUCUGUGAGGGcACGGGUATsT	57%	2%	67%	4%
ND8412	255	uAGcAcAcuAuAAcAucUGTsT	256	cAGAUUGUuAuAGUGUGCUATsT	30%	2%	41%	1%
ND8413	257	GGUGuGuAuucAcucucGcTsT	258	GcAGGAGUGAAuAcAcACCTsT	73%	1%	90%	9%
ND8414	259	cAuGaucAAGGAGuGuGcTsT	260	GCCAcACUCCUUGAUcAUcTsT	65%	2%	67%	5%
ND8415	261	AcucAcGauGGccucGGUtsT	262	ACCGAGSGCcAUUGUGAGUsT	96%	6%	95%	6%
ND8416	263	GGAGcuuuGAcAAGGAACuTsT	264	AGUUCcUUGUcAAAGCUcTsT	24%	1%	28%	4%
ND8417	265	AuAcCCcGuGcccuAcAGATsT	266	UCUGUGAGGGcACGGGUATsT	54%	1%	62%	2%
ND8418	267	GGAGUGccAAAAGuCAAcATsT	268	UGUUGAcUuuUGGccAcUCCTsT	93%	2%	86%	11%
ND8419	269	AAcUAcAAAACcAAuucUGTsT	270	cAGAAUUGGUUUGuAGUUsT	101%	5%	108%	19%
ND8420	271	uGcuGGAGuGuuGcuGuuGtsT	272	cAAcAGcAAcAcUcAcGcATsT	29%	1%	26%	1%
ND8421	273	AGGUucucuGcAAcAGGcTsT	274	GCCGGUUGcAGGAGCCUtsT	95%	10%	91%	17%
ND8422	275	cuuuGcAuGAuGuAcuGGTsT	276	CcAGuAcAuCAUUGCCAAAGTsT	86%	3%	84%	6%
ND8423	277	cAuucGcAcccuAAuuccTsT	278	GGAUUGAGGGUGcAGAUcTsT	82%	11%	73%	4%
ND8424	279	cGAcuGcAccAAGAAUGGcTsT	280	GcCAUUCUUGGUUGcAGUcTsT	70%	8%	69%	7%
ND8425	281	AAAAcAcAAcAAGGGUAcTsT	282	GUACCGUGGUUGUUGUUsTsT	95%	6%	106%	12%
ND8426	283	cAuucGcUGGAGuGuuGcuTsT	284	AGcAAcAcUcCcAGcAGAUcTsT	30%	2%	37%	1%
ND8427	285	ccuAcAuucuuAuCCcGcTsT	286	CGCGAAAGAAAGAUAGGcTsT	42%	6%	30%	1%
ND8428	287	GccuAcAuucuuAuCCcGcTsT	288	CGCGAAuAAGAAUGUAGGcTsT	65%	7%	56%	3%
ND8429	289	GAGUGGuAccGcuuccAcuTsT	290	AGUGAAAGCGGUACcACUtsT	95%	11%	86%	19%
ND8430	291	GGuAccGcuuccAcuAcuTsT	292	AUGuAGUGGAAGCGGUACCTsT	111%	19%	96%	14%
ND8431	293	GuGGuAccGcuuccAcuAcTsT	294	GUAGUGGAAGCGGUACcACTsT	98%	13%	52%	26%
ND8432	295	GAuuAcucucAcuuccAcTsT	296	GUGGAAUGAGAGUAUUCCTsT	111%	21%	73%	27%
ND8433	297	AAuuAcucucAcuuccAcTsT	298	GUGGAAUGAGAGUAUUCCTsT	109%	22%	105%	7%
ND8434	299	uAcucucAcuuccAccAccTsT	300	GGUGGUGGAAGUGAGAUATsT	106%	23%	95%	7%
ND8435	301	AGUGGuAccGcuuccAcuATsT	302	uAGUGGAGCGGUAcCAcUtsT	109%	18%	102%	9%
ND8436	303	GGcAAcuucAuucucGccTsT	304	GCGAAGAUAGAUUGCCCTsT	109%	18%	107%	14%
ND-8501	305	AGCCGUAGCGUGGCCUcTsT	306	GGAGGAGCGCUACGGGCUtsT	84%	14%	69%	3%
ND-8502	307	CCGGGUAAUGGUUGcACGGTsT	308	CCGUGcACCAUuACCCGcTsT	41%	6%	30%	2%
ND-8503	309	AUGCUAUCCGGACAGAAcATsT	310	UGUUCUGUGCGAUAGCAUsT	11%	2%	10%	2%
ND-8504	311	UGCUAUCCGGACAGAAcATsT	312	UUGUUCUGUGCGAUAGCAUsT	15%	2%	10%	0%
ND-8505	313	GCCCGUUUAUGUuAGCUcTsT	314	GGAGCAUAAGAAACGGUtsT	23%	3%	16%	1%
ND-8506	315	GCCCGUAGCGUGGCCUcCATsT	316	UGGAGGCCAcCGCUACGGGcTsT	32%	3%	22%	1%
ND-8507	317	CCGGAAUUAAAGAGGAGcTsT	318	GCUCCUuuUAAUUUCGGTsT	35%	4%	24%	1%
ND-8508	319	CCGAAGGUUCGAAGCCGATsT	320	UCGGCUUGGAAACCUUCGcTsT	19%	2%	13%	1%
ND-8509	321	GCAAUUCGGCCUGCUUUCtsT	322	GAAAGCAGGCCGAAUUGcTsT	12%	1%	8%	1%
ND-8510	323	GGCGAAUuACUCUCACUUCtsT	324	CAAGUGAGAGUAUUCGcTsT	21%	2%	18%	1%
ND-8511	325	GCGAAUuACUCUCACUUCtsT	326	GGAAGUGAGAGUAUUCGcTsT	12%	2%	8%	1%
ND-8512	327	AACCAGGCGAAUuACUCUcTsT	328	CAGAGUAUuUCGCGUGGUtsT	99%	11%	79%	5%
ND-8513	329	GGUAAUGGUGcACGGGcAGTsT	330	CUGCCCGUGcACCAUuACCTsT	61%	6%	42%	4%
ND-8514	331	CUCACGAUGGCCUUGGUGTsT	332	CAcCGAGGcCAUcUGGAGTsT	94%	11%	70%	4%
ND-8515	333	GCUCCGAAGGUUCGAAGcTsT	334	GCUUCGGAACCUUCGGAGcTsT	18%	2%	17%	2%
ND-8516	335	GCGAUuACUGGUUCcAGGcTsT	336	CCUGGAGACCAGUuUCGGcTsT	14%	1%	12%	1%
ND-8517	337	CCGAUuACUGGUUCcAGGcTsT	338	GCCUGGAGACCAGUuUCGGcTsT	42%	5%	33%	2%
ND-8518	339	UGCGUUGcACCAuACUUCtsT	340	AAAGUuAGGUGCAACAGcATsT	10%	1%	9%	0%
ND-8519	341	AACGGUCUGUCCUUGAUcTsT	342	GCAUcAGGGACAGACCGUtsT	60%	7%	52%	8%
ND-8520	343	UUAAcUUGCGGCCUUGGcTsT	344	ACGCCAGCCCGCAAGUuAATsT	82%	25%	77%	18%
ND-8521	345	GCUGGUuACUCACGAUcGcTsT	346	GCCAUcGUGAGUuAACCGcTsT	36%	4%	34%	7%
ND-8522	347	UUACUCACGAUcGGCCUUGcTsT	348	CGAGGCCAUcUGGAGUuAATsT	105%	21%	113%	21%
ND-8523	349	GAAGCCGAUuACUGGUUCcTsT	350	GGAGACCAGUuUCGGCUcTsT	24%	2%	18%	2%
ND-8524	351	GAUuACUGGUUCcAGGCGcTsT	352	CGGCCUGGAGACCAGUuUCtsT	30%	5%	25%	3%
ND-8525	353	AUuACUGGUUCcAGGCGcATsT	354	UCGGCCUGGAGACCAGUuUCtsT	12%	1%	11%	2%

ND-8526	355	CAACGGUCUGUCCUGAUGTsT	356	CAUCAGGGACAGACCGUUGTsT	24%	7%	24%	2%
ND-8527	357	UUUAACUUUGCGCCUGGCGTsT	358	CGCCAGGCGCGAAGUUAATsT	122%	6%	107%	9%
ND-8528	359	UACUCACGAUGGCCUCGGTsT	360	CCGAGGGCCAUUCGUGAGUATsT	78%	6%	84%	7%
ND-8529	361	UUUCGGAGAGUACUUCAGTsT	362	GUUGAAGUACUCCGAAATsT	87%	18%	80%	17%
ND-8530	363	GCAGACGCUUUUGACCUUGTsT	364	CAGGUCAAAGAGCGUCUGTsT	14%	2%	13%	0%
ND-8531	365	CUACAUUUUAUCCGGCGTsT	366	CCGGGAUAGAGAGUAGTsT	20%	4%	18%	3%
ND-8532	367	AGCCAAUUACUUCACUUUsT	368	AAGUGAGAGUAAUUCGCUUsT	25%	5%	18%	1%
ND-8533	369	CCGUUCAACCAGGUCUCCTsT	370	GGAGGCUUGGUAGAGCGTsT	30%	11%	22%	2%
ND-8534	371	CAACCACUAAGACGGCCTsT	372	GGCCUUCUUAUUGCGUUGTsT	33%	4%	23%	1%
ND-8535	373	AUGAAGACGGCUUUCGGTsT	374	CCAGAAAGCGGUUCAUUsT	114%	12%	84%	15%
ND-8536	375	AGCACAAACCGAUGAAGACTsT	376	GUCUUAUUGCGGUUGUCUUsT	18%	1%	16%	3%
ND-8537	377	UGAGUUCCACCGCUUCUUsT	378	UAGGAGGCGGGAACCGGATsT	25%	0%	26%	3%
ND-8538	379	CUGCUUUAACAGCAUACTsT	380	GUUUGUUGGUAGAGAGTsT	12%	1%	13%	2%
ND-8539	381	GAGGGAGUGGUACCGUUCUsT	382	GAAGCGUUAACCUCCUCUsT	43%	1%	47%	14%
ND-8540	383	CCUUUAUUGGUAUGUGGUsT	384	CCACCAUUAUCCAUAAAGTsT	61%	5%	60%	8%
ND-8541	385	UGAGGUAUGGUACCGCUUsT	386	AAGCGGACGACUCCGUCATsT	36%	5%	35%	5%
ND-8542	387	CCUGCAAACAGGCGAAUUsT	388	UAAUUCGCGUUGUUGAGTsT	19%	2%	16%	1%
ND-8543	389	GGCUUGCGUGGAGACCUUsT	390	GAGGUUCUCCAGCCAGGCTsT	28%	7%	20%	2%
ND-8544	391	UGCUUUUCGAGAGUACUUsT	392	AAGUACUUCGAAAAGCATsT	22%	5%	17%	1%
ND-8545	393	CCGUAGCGUGGCUCCAGTsT	394	CUGGAGGCGACGCUCCGATsT	25%	8%	22%	2%
ND-8546	395	CCGUAGCGUGGCUCCAGTsT	396	GCUUGAGCCACGCUACCGTsT	62%	5%	57%	9%
ND-8547	397	CCAGGCGAAUUAUUCUACTsT	398	GUAGAGUAAUUCGCGUGTsT	23%	11%	16%	2%
ND-8548	399	GAAACUGCUAUUUAUUAATsT	400	UUUAAAGUAUAGCAGUUCUsT	9%	3%	3%	0%
ND-8549	401	GCCCGGUAUUGGUGCAGTsT	402	CGUGCAUUAUCCGCGGATsT	87%	9%	92%	14%
ND-8550	403	CCCGGUAUUGGUGCAGTsT	404	CCGUCAUUAUCCGCGGATsT	19%	12%	14%	1%
ND-8551	405	CCGGUAUUGGUGCAGCGTsT	406	GCCGUGCAUUAUCCGCGTsT	68%	11%	73%	3%
ND-8552	407	GGUAAUUGGUGCAGCGTsT	408	UGCCGUGCAUUAUCCGCGTsT	30%	6%	33%	2%
ND-8553	409	UAAUUGGUGCAGCGGAGTsT	410	UCCGCGGUGCAGCAUUAUsT	29%	3%	31%	1%
ND-8554	411	CUGGUUAUUAUUGGUGTsT	412	GGCCAUUCGAGUAACAGTsT	74%	15%	66%	8%
ND-8555	413	GUUAUCAGUUGGCUCCUsT	414	GAGGGCAUUGUAGUAACTsT	91%	21%	88%	10%
ND-8556	415	UGUACAGUUGGCUCCUsT	416	GAGGGUACCAUUGUAGATsT	72%	4%	76%	12%
ND-8557	417	UGCUUCGAAAGGUUCGAGTsT	418	CUUCGCGAUCUUCGCGAGTsT	51%	2%	59%	18%
ND-8558	419	UCCGAAAGGUUCGAAAGTsT	420	CGGUUCGGAACCUUCGGATsT	109%	11%	77%	13%
ND-8559	421	UUCGAAAGCGUAUUGGUsT	422	ACCAGUAUCGCGUUCGGAATsT	46%	20%	33%	6%
ND-8560	423	AGCCGAUACUGGCUCCAGTsT	424	CUGGAGAACAGUAUCGCGUsT	15%	6%	10%	1%
ND-8561	425	CUUGGUACUGGCUUGAATsT	426	GUUCAGAGGAGUACCAAGTsT	16%	3%	12%	3%
ND-8562	427	CUCCGUAAGCACAUUAATsT	428	UUUAUUGUUGCUACGGAGTsT	14%	6%	10%	1%
ND-8563	429	UCCGUAGCACACUUAUACTsT	430	GUUAUAGUUGCUACGGGATsT	43%	11%	36%	4%
ND-8564	431	UGCACCAUUAUUCUUGUATsT	432	UACAAGAAAGUAUGGUGATsT	17%	6%	13%	3%
ND-8565	433	UUCCCGUUUAUUGUUGUUsT	434	AGCAUACAUAAACGGCAATsT	84%	2%	103%	12%
ND-8566	435	UGCCCGUUUAUUGUUGUUsT	436	GAGCAUACAUAAACGGGATsT	69%	25%	93%	4%
ND-8567	437	GGACCCUAGACCUCUGCAGTsT	438	CUGCAGAGSUCUAGGGUCCTsT	29%	8%	33%	2%
ND-8568	439	CCUAGACCUUCGAGCCATsT	440	UGGGCUGCAGAGGUUAGGUsT	18%	2%	19%	1%
ND-8569	441	UGGCAUGAUUACUGGCAATsT	442	UUCCAGUAUUAUUCAGATsT	19%	3%	20%	5%
ND-8570	443	UACUUGCAAUUCGGCUUGTsT	444	GCAGGCGAAUUCGAGUATsT	86%	15%	83%	16%
ND-8571	445	AAUUCGGCCUGCUUUUCGGTsT	446	CCGAAAAGCAGGCCAAUUsT	19%	3%	24%	4%
ND-8572	447	CUGCUUUUCGGAGUACUUsT	448	AGUACUUCGAAAAGCAGTsT	8%	2%	12%	2%
ND-8573	449	UUCCGAGAGUACUUCAGUUsT	450	AGCUGAAGUACUUCGAAATsT	27%	3%	40%	5%
ND-8574	451	AGCAGACGCUUUUGACCUUsT	452	AGGUCAAAGAGCGUCUGUUsT	15%	0%	19%	4%
ND-8575	453	CUUGCAGGCCUUGAGGUGTsT	454	GACCCUACAGGCCUUGCAAGTsT	35%	1%	40%	4%
ND-8576	455	UGGCUUUUAUUCGCGCUUsT	456	AGGCCCAAGUUAAGGCATsT	47%	3%	53%	8%
ND-8577	457	GCUUUAACUUGCGGCUUGTsT	458	CCAGGCCCAAGUUAAGGCTsT	20%	2%	25%	5%

5 Tabla 1B: ARN_i seleccionados en un conjunto de selección extendido (ARN_i “sólo humanos”): Se identificaron 344 secuencias de ARN_i adicionales y se diseñaron para que fuesen completamente complementarias a las secuencias de alfa-ENaC humanas, según los criterios de diseño descritos en la sección de ejemplos. Se modificaron todos los ARN_i enumerados en este conjunto de selección sólo con una unión fosforotioato en el extremo 3' entre los nucleótidos 20 y 21 de cada hebra. Se muestra la expresión residual en porcentaje de alfa-ENaC en el ensayo de transfección de una única dosis (se hace referencia a la sección de ejemplos para los métodos usados).

ID de dúplex	ID de sec.	Sentido	ID de sec.	Antisentido	1ª selección de una única dosis a 50 nM en H441; MV	DE
ND-10445	609	CUGCGGCUAAGUCUCUUUUTsT	610	AAAAGAGACUUAGCCGCAGTsT	94%	8%
ND-10446	611	AUCGCGACAGAACA AUUACTsT	612	GUAAUUGUUCUGUCGCGAUTsT	13%	2%
ND-10447	613	UCGCGACAGAACA AUUCATsT	614	UGUAAUUGUUCUGUCGCGATsT	18%	1%
ND-10448	615	CCCGUUUAUGUAUGCUCATsT	616	UGGAGCAUACA UAAACGGTsT	41%	1%
ND-10449	617	CCCGGUAAGUAAAGGCAGTsT	618	CUGCCUUACUACCCGGTsT	23%	1%
ND-10450	619	GGUACCCGGAAAUAAAGATsT	620	UCUUUAAUUCCGGGUACCTsT	14%	2%
ND-10451	621	GCUAUCGCGACAGAACA AUTsT	622	AUUGUUCUGUCGCGAUAGCTsT	24%	2%
ND-10452	623	UAUCGCGACAGAACA AUUATsT	624	UAAUUGUUCUGUCGCGAUATsT	12%	1%
ND-10453	625	UGC GGCUAAGUCUCUUUUTsT	626	AAAAGAGACUAGCCGCATsT	46%	3%
ND-10454	627	GGCGAUUAUGGCGACUGCATsT	628	UGCAGUCGCCAUAAUCGCTsT	14%	0%

ND-10455	629	AUGUCUAGCCCAUCAUCCUTsT	630	AGGAUGAUGGGCUAGACAUTsT	12%	2%
ND-10456	631	CUACAGGUACCCGGAAAUUTsT	632	AAUUUCCGGGUACCUGUAGTsT	28%	2%
ND-10457	633	CCGUCGAGCCCGUAGCGUGTsT	634	CACGCUACGGGCUCGACGGTsT	27%	3%
ND-10458	635	CGCGACAGAACAAUUAACACTsT	636	GUGUAAUUGUUCUGUCGGTsT	39%	7%
ND-10459	637	AGGUACCCGGAAAUUAAAGTsT	638	CUUUAUUUCCGGGUACCUTsT	30%	3%
ND-10460	639	CAUGCACGGGUUCCUGCCTsT	640	GGCAGGAAACCCGUGCAUGTsT	95%	6%
ND-10461	641	AGCUUGCGGGACAACAACCTsT	642	GGUUGUUGUCCCGAAGCUTsT	94%	8%
ND-10462	643	ACUGCGGCUAAGUCUCUUTsT	644	AAAGAGACUAGCCGCAGUTsT	13%	2%
ND-10463	645	CAUCCCUUAGAACCCUGCUTsT	646	AGCAGGGUUCUAAGGGAUGTsT	18%	1%
ND-10464	647	ACCCGGGUAAGUAAAGGCATsT	648	UGCCUUUACUUACCCGGGUTsT	41%	1%
ND-10465	649	GAUUUUGGCGACUGCACCATsT	650	UGGUGCAGUCGCCAUAAUCTsT	23%	1%
ND-10466	651	CUCGGACAAGCUCGUCUUCTsT	652	GAAGACGAGCUUGUCCGAGTsT	14%	2%
ND-10467	653	GCGAUUAUGGCGACUGCACTsT	654	GUGCAGUCGCCAUAAUCGCTsT	24%	2%
ND-10468	655	AAUUAACCCGUAACAACATsT	656	UGUUGUUGACGGUGUAAUUTsT	12%	1%
ND-10469	657	AACUGCCGUUGAUGUGUGTsT	658	CCACACAUCAACGGCAGUUTsT	46%	3%
ND-10470	659	AACUGCGGCUAAGUCUCUUTsT	660	AAGAGACUUAGCCGCAGUUTsT	14%	0%
ND-10471	661	CCGCUGAUAAACCAGGACAATsT	662	UUGUCCUGGUUAUCAGCGTsT	12%	2%
ND-10472	663	AAGGGUACACGCAGGCAUGTsT	664	CAUGCCUGCGUGUACCCUUTsT	28%	2%
ND-10473	665	CCGGGUAAGUAAAGGCAGATsT	666	UCUGCCUUUACUUACCCGGTsT	27%	3%
ND-10474	667	CCCAUACCAGGUCUCAUGTsT	668	CCAUGAGACCUGGUJAUGGTsT	39%	7%
ND-10475	669	AUUUAUGGCGACUGCACCAATsT	670	UUUGGUGCAGUCGCCAUAAUTsT	30%	3%
ND-10476	671	AUGCACGGGUUUCUGCCCTsT	672	GGGCAGGAAACCCGUGCAUTsT	95%	6%
ND-10477	673	CUAGCCUCCACAGUCCACTsT	674	GUGGACUGUGGAGGGCUAGTsT	43%	7%
ND-10478	675	CAGGUACCCGGAAAUJAAATsT	676	UUUAAUUUCCGGGUACCUGTsT	11%	1%
ND-10479	677	AAUACAGCUCCUUCACCACTsT	678	GUGGUGAAGGAGCUGUAUUTsT	30%	3%
ND-10480	679	CACGGGUUUCUGCCAGCTsT	680	GCUGGGCAGGAAACCCGUGTsT	19%	1%
ND-10481	681	GGACUGAAUCUUGCCCGUUTsT	682	AACGGGCAAGAUUCAGUCCTsT	14%	2%
ND-10482	683	CGUUUAUGUAUGCUCCAUGTsT	684	CAUGGAGCAUACAUAAACGTsT	15%	1%
ND-10483	685	GGGUACUGCUACUAUAAGCTsT	686	GCUUAUAGUAGCAGUACCTsT	11%	0%
ND-10484	687	UCGGUGUUGUCUGUGGUGTsT	688	CCACCACAGACAACACCGATsT	65%	5%
ND-10485	689	AAACUGCCGUUGAUGUGUGTsT	690	CACACAUCAACGGCAGUUTsT	73%	6%
ND-10486	691	GCGAAACUUGGAGCUUUGATsT	692	UCAAAGCUCCAAGUUCGCTsT	8%	1%

ND-10487	693	GGCCCGUCGAGCCCGUAGCTsT	694	GCUACGGGCUCGACGGGCTsT	26%	3%
ND-10488	695	GCGACAGAACAAUACACCTsT	696	GGUGUAAUUGUUCUGUCGCTsT	10%	2%
ND-10489	697	GCGACGGCUUAAGCCAGCTsT	698	GGCUGGCUUAAAGCCGUCGCTsT	50%	1%
ND-10490	699	GACCCGGUAAGUAAAGGCTsT	700	GCCUUUACUUAACCCGGGUCTsT	74%	1%
ND-10491	701	UUUAUCACUCCGCCUUCUCTsT	702	GAGAAGGCGGAGUGAUCAATsT	80%	7%
ND-10492	703	UCUAGCCCUCCACAGUCCATsT	704	UGGACUGUGGAGGGCUAGATsT	69%	4%
ND-10493	705	GUUUCACCAAGUGCCGAATsT	706	UUCCGGCACUUGGUGAACTsT	23%	3%
ND-10494	707	CUCAACUCGGACAAGCUCGTsT	708	CGAGCUUGUCCGAGUUGAGTsT	45%	6%
ND-10495	709	CAACUCGGACAAGCUCGUCTsT	710	GACGAGCUUGUCCGAGUUGTsT	23%	3%
ND-10496	711	ACCCGGAAAUUAAAGAGGATsT	712	UCCUCUUUAAUUAUCCGGGUTsT	13%	2%
ND-10497	713	CCCGGAAAUUAAAGAGGAGTsT	714	CUCCUCUUUAAUUAUCCGGGTsT	19%	1%
ND-10498	715	CACCACUCUCGUGGCCGCTsT	716	GCCGGCCACGAGAGUGGUTsT	94%	11%
ND-10499	717	CGUCGAGCCCGUAGCGGCTsT	718	CCACGCUACGGGCUCGACGTsT	13%	1%
ND-10500	719	GCUUGCGGGACAACAACCTsT	720	GGGUUGUUGUCCCGCAAGCTsT	49%	2%
ND-10501	721	GAAUCAACAACGGUCUGUCTsT	722	GACAGACCGUUGUUGAUUCTsT	18%	2%
ND-10502	723	GGCGGAUUAUGGCGACUGCTsT	724	GCAGUCGCCAUAAUCCGCTsT	8%	1%
ND-10503	725	CGAUUAUGGCGACUGCACCTsT	726	GGUGCAGUCGCCAUAAUCGTsT	17%	1%
ND-10504	727	UCUGCUGGUUACUCACGAUTsT	728	AUCGUGAGUAACCAGCAGATsT	38%	4%
ND-10505	729	CUAUCGCGACAGAACAAUUTsT	730	AAUUGUUCUGUCGCGAUAGTsT	9%	1%
ND-10506	731	CAAUUAACACCGUCAACAATsT	732	GUUGUUGACGGUGUAAUUGTsT	11%	1%
ND-10507	733	ACCGUCAACAACAAGAGAATsT	734	UUCUCUUGUUGUUGACGGUTsT	9%	1%
ND-10508	735	CUCCUCGGUUGUUGUCUGTtsT	736	CACAGACAACACCGAGGAGTsT	78%	5%
ND-10509	737	GGAGGUAGCCUCCACCCUGTsT	738	CAGGGUGGAGGCUACCCUCTsT	18%	1%
ND-10510	739	GGAGAGGUUUCUCACACCATsT	740	UGGUGUGAGAAACCUCUCTsT	13%	1%
ND-10511	741	CUGCCGUUGAUGUGUGGAGTsT	742	CUCCACACAUAACGGCAGTsT	19%	2%
ND-10512	743	UGCCGUUGAUGUGUGGAGTsT	744	CCUCCACACAUAACGGCATsT	82%	4%
ND-10513	745	AGAUGGGUAAGGGCUCAGGTsT	746	CCUGAGCCCUUACCCAUCUTsT	24%	1%
ND-10514	747	AGAACAGUAGCUGAUGAAGTsT	748	CUUCAUCAGCUACUGUUCUTsT	15%	0%
ND-10515	749	GCGGCUAAGUCUCUUUUUCTsT	750	GAAAAAGAGACUUAGCCGCTsT	13%	1%
ND-10516	751	CCUAAGAAACCGCUGAUATsT	752	UUAUCAGCGGUUCUUAGGTsT	6%	0%

ND-10517	753	GAAACCGCUGAUAAACCAGGTsT	754	CCUGGUUAUCAGCGGUUUCTsT	13%	0%
ND-10518	755	AACCGCUGAUAAACCAGGACTsT	756	GUCCUGGUUAUCAGCGGUUTsT	42%	2%
ND-10519	757	ACCGCUGAUAAACCAGGACATsT	758	UGUCCUGGUUAUCAGCGGUTsT	11%	1%
ND-10520	759	CCAAGGGUACACGCAGGCATsT	760	UGCCUGCGUGUACCCUUGGTsT	19%	1%
ND-10521	761	CAAGGGUACACGCAGGCAUTsT	762	AUGCCUGCGUGUACCCUUGTsT	12%	0%
ND-10522	763	AGGGUACACGCAGGCAUGCTsT	764	GCAUGCCUGCGUGUACCCUTsT	23%	1%
ND-10523	765	GUACACGCAGGCAUGCAGTsT	766	CGUGCAUGCCUGCGUGUACTsT	27%	1%
ND-10524	767	AGGCAUGCACGGGUUUCCTsT	768	AGGAAACCCUGUGCAUGCCUTsT	14%	0%
ND-10525	769	GGCAUGCACGGGUUUCUGTsT	770	CAGGAAACCCUGUGCAUGCCTsT	18%	3%
ND-10526	771	ACGGGUUUCUGCCAGCGTsT	772	CGCUGGGCAGGAAACCCGUTsT	30%	1%
ND-10527	773	GAGCAGACCCGGGUAAGUATsT	774	UACUUAACCCGGGUCUGCUCTsT	24%	2%
ND-10528	775	AGCAGACCCGGGUAAGUAATsT	776	UUACUUAACCCGGGUCUGCUTsT	24%	2%
ND-10529	777	GGGUAAGUAAAGGCAGACCTsT	778	GGUCUGCCUUUACUUAACCTsT	39%	3%
ND-10530	779	AGCCUCAUACCCGUGCCCTsT	780	AGGCACGGGUAUGAGGCUTsT	82%	5%
ND-10531	781	GUGAACGCUUCUGCCACAUTsT	782	AUGUGGCAGAAGCGUUCACTsT	13%	1%
ND-10532	783	AAAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	784	AAGCGGAGUGAUCAAUUUTsT	18%	2%
ND-10533	785	AAUUGAUCACUCCGCCUUCTsT	786	GAAGCGGAGUGAUCAAUUUTsT	19%	0%
ND-10534	787	GCCUUGCGGUCAGGGACUGTsT	788	CAGUCCUGACC GCAAGGCTsT	12%	1%
ND-10535	789	CUUGCGGUCAGGGACUGAATsT	790	UUCAGUCCUGACC GCAAGTsT	11%	0%
ND-10536	791	UUGCGGUCAGGGACUGAATsT	792	AUUCAGUCCUGACC GCAATsT	12%	0%
ND-10537	793	AUGUAUGCUCCAUGUCUAGTsT	794	CUAGACAUGGAGCAUACAUTsT	21%	1%
ND-10538	795	AGCAAGUAGGCAGGAGCUCTsT	796	GAGCUCCUGCCUACUUGCUTsT	19%	1%
ND-10539	797	CAGCCCAUACCCAGGUCUCATsT	798	UGAGACCUGGU AUGGGCUGTsT	27%	2%
ND-10540	799	CAGCCGUCGGAACCGCGTsT	800	CCGCAGGUCGCGACGGCUGTsT	44%	4%
ND-10541	801	GGGCCGUCGAGCCCGUAGTsT	802	CUACGGGUCGACGGGCCCTsT	71%	6%
ND-10542	803	CGUAGCGUGGCCUCCAGCUTsT	804	AGCUGGAGGCCACGCUACGTsT	84%	9%
ND-10543	805	GGUGAGGGAGUGGUACCGCTsT	806	GCGGUACCACUCCUCACCTsT	108%	8%
ND-10544	807	AAAGUACACACAGCAGGUGTsT	808	CACCUGCUGUGUACUUUTsT	140%	7%
ND-10545	809	CCAGGUUGACUUCUCCUCATsT	810	UGAGGAGAAGUCAACCGGTsT	18%	2%
ND-10546	811	UGUUUCACCAAGUGCCGGATsT	812	UCCGGCACUUGGUGAAACATsT	31%	2%

ND-10547	813	UGCUGGUUACUCACGAUGGTsT	814	CCAUCGUGAGUAACCAGCATsT	144%	10%
ND-10548	815	UCCUCGGUGUUGUCUGUGGTsT	816	CCACAGACAACACCGAGGATsT	106%	14%
ND-10549	817	AGGUAGCCUCCACCCUGGTsT	818	GCCAGGGUGGAGGCUACCUtsT	74%	15%
ND-10550	819	GCCGUUGAUGUGUGGAGGGTsT	820	CCCUCCACACAUCAACGGCTsT	26%	4%
ND-10551	821	GAUGGGUAAGGGCUAGGATsT	822	UCCUGAGCCCUUACCCAUCTsT	22%	1%
ND-10552	823	CCCAACUGCGGCUAAGUCUTsT	824	AGACUUAGCCGCAGUUGGGTsT	18%	2%
ND-10553	825	CCAAGCGAAACUUGGAGCUTsT	826	AGCUCCAAGUUUCGCUUGGTsT	16%	1%
ND-10554	827	GGGUACACGCAGGCAUGCATsT	828	UGCAUGCCUGCGUGUACCTsT	19%	2%
ND-10555	829	UGCACGGGUUUCUGCCCATsT	830	UGGGCAGGAAACCCGUGCATsT	28%	2%
ND-10556	831	CUCCUCUAGCCUCAUACCTsT	832	GGGUAUGAGGCUAGAGGAGTsT	109%	8%
ND-10557	833	UCCUCUAGCCUCAUACCGTsT	834	CGGGUAUGAGGCUAGAGGATsT	117%	7%
ND-10558	835	UCUAGCCUCAUACCCGUGCTsT	836	GCACGGGUAUGAGGCUAGATsT	128%	9%
ND-10559	837	UUCAUACCUCUACAUGUCUTsT	838	AGACAUGUAGAGGUAGAATsT	52%	4%
ND-10560	839	UCUACAUGUCUGCUUGAGATsT	840	UCUCAAGCAGACAUGUAGATsT	15%	2%
ND-10561	841	AUAUUUCCUCAGCCUGAAATsT	842	UUUCAGGCUAGGAAUAUTsT	15%	2%
ND-10562	843	AACUCCUAUGCAUCCCUUATsT	844	UAAGGGAUGCAUAGGAGUUTsT	14%	1%
ND-10563	845	GCAUCCCUJAGAACCUGCTsT	846	GCAGGGUUCUAAGGGAUGCTsT	20%	1%
ND-10564	847	UGAUCACUCCGCCUUCUCCTsT	848	GGAGAAGGGCGAGUGAUCATsT	67%	7%
ND-10565	849	UGUAAGUGCCUUGCGGUCATsT	850	UGACCGCAAGGCACUUACATsT	17%	2%
ND-10566	851	CCUUGCGGUCAGGGACUGATsT	852	UCAGUCCUGACCGCAAGGTsT	14%	1%
ND-10567	853	AAUCUUGCCCGUUUAUGUATsT	854	UACAUAAACGGCAAGAUTsT	13%	2%
ND-10568	855	CCGUUUAUGUAUGCUCCAUTsT	856	AUGGAGCAUACAUAACGGTsT	19%	6%
ND-10569	857	UGUAUGCUCCAUGUCUAGCTsT	858	GCUAGACAUGGAGCAUACATsT	87%	13%
ND-10570	859	CAUGUCUAGCCCAUCAUCCTsT	860	GGAUGAUGGGCUAGACAUGTsT	33%	4%
ND-10571	861	AGUAGGCAGGAGCUCAAUATsT	862	UAUUGAGCUCCUGCCUACUTsT	11%	1%
ND-10572	863	CCUACAGGUACCCGGAAAUTsT	864	AUUUCCGGGUACCUUGUAGGTsT	22%	3%
ND-10573	865	CCCGUCGAGCCCGUAGCGUTsT	866	ACGCUACGGGCUAGACGGTsT	23%	1%
ND-10574	867	GCGGUGAGGGAGUGGUACCTsT	868	GGUACCACUCCUCACCGCTsT	30%	1%
ND-10575	869	UUAUGGGGACUGCACCAGTsT	870	CUUGGUGCAGUCGCCAUAAATsT	77%	6%
ND-10576	871	CUAUAAGCUCCAGGUUGACTsT	872	GUCAACCUGGAGCUUAUAGTsT	11%	1%

ND-10577	873	UAUAAGCUCCAGGUUGACUTsT	874	AGUCAACCUGGAGCUUAUATsT	42%	8%
ND-10578	875	AGGUUGACUUCUCCUCAGATsT	876	UCUGAGGAGAAGUCAACCUTsT	13%	3%
ND-10579	877	CUGGGCGUUCACCAAGUTsT	878	ACUUGGUGAAACAGCCCAGTsT	19%	6%
ND-10580	879	AACAAUUACACCGUCAACATsT	880	UGUUGACGGUGUAAUUGUUTsT	13%	1%
ND-10581	881	UGGGUAAGGGCU CAGGAAGTsT	882	CUUCCUGAGCCCUUACCCATsT	20%	3%
ND-10582	883	GGGUAAGGGCU CAGGAAGTsT	884	ACUUCUGAGCCCUUACCCTsT	22%	3%
ND-10583	885	CACCCAACUGCGGCUAAGUTsT	886	ACUUGACCGCAGUUGGGUGTsT	22%	10%
ND-10584	887	ACCCAACUGCGGCUAAGUCTsT	888	GACUUGAGCCGAGUUGGGUTsT	22%	5%
ND-10585	889	CCAACUGCGGCUAAGUCUCTsT	890	GAGACUUGAGCCGAGUUGGTsT	14%	2%
ND-10586	891	CUUGGAUCAGCCAAGCGAATsT	892	UUCGCUUGGCUGAUCCAAGTsT	15%	1%
ND-10587	893	GCCAAGCGAAACUUGGAGCTsT	894	GCUCCAAGUUCGCUUGGCTsT	17%	2%
ND-10588	895	UCCUAAGAAACCGCUGAUATsT	896	UAUCAGCGGUUUCUUGGATsT	11%	2%
ND-10589	897	GCAUGCACGGGUUUCUGCTsT	898	GCAGGAAACCCGUGCAUGCTsT	24%	8%
ND-10590	899	UGUUACUUGGCAAUUCCTsT	900	GGGAAUUGCCUAAGUAACATsT	48%	10%
ND-10591	901	CUAGGGCUAGAGCAGACCCTsT	902	GGGUCUGCUCUAGCCCUAGTsT	58%	10%
ND-10592	903	CUCUAGCCUCAUACCCGUGTsT	904	CACGGGUUGAGGCUAGAGTsT	34%	5%
ND-10593	905	UUAGAACCUGCUCAGACATsT	906	UGUCUGAGCAGGGUUCUATsT	14%	1%
ND-10594	907	UGUGAACGCUUCUGCCACATsT	908	UGUGGCAGAAGCGUUCACATsT	15%	0%
ND-10595	909	AUUGAUCACUCCGCCUUCUTsT	910	AGAAGGCGGAGUGAUCAAUTsT	43%	1%
ND-10596	911	UCACUCCGCCUUCUCCUGTsT	912	CCAGGAGAAGGCGGAGUGATsT	90%	5%
ND-10597	913	GCGGUCAGGGACUGAAUCUTsT	914	AGAUUCAGUCCUGACCCTsT	11%	0%
ND-10598	915	GGUCAGGGACUGAAUCUUGTsT	916	CAAGAUUCAGUCCUGACCCTsT	13%	1%
ND-10599	917	GUAUGCUCCAUGUCUAGCCTsT	918	GGCUAGACAUGGAGCAUACTsT	28%	3%
ND-10600	919	CCAUGUCUAGCCCAUCAUCTsT	920	GAUGAUGGGCUAGACAUGGTsT	12%	1%
ND-10601	921	GAUCGAGUUCACCGCUCCTsT	922	GGAGCGGUGGAACUCGAUCTsT	17%	1%
ND-10602	923	GGACUCUAGCCCUCCACAGTsT	924	CUGUGGAGGGCUAGAGUCCTsT	41%	4%
ND-10603	925	UCACCACUCUCGUGGCCGCTsT	926	CCGGCCACGAGAGUGGUGATsT	83%	3%
ND-10604	927	CAGCUUGCGGGACAACAATsT	928	GUUGUUGUCCCGCAAGCUGTsT	21%	1%
ND-10605	929	CAUCUUCUUAUCCGCGGCCCTsT	930	GGGCCCGGGAUAGAAGAUGTsT	26%	2%
ND-10606	931	AUAAGCUCCAGGUUGACUUTsT	932	AAGUCAACCUGGAGCUUAUTsT	15%	1%

ND-10607	933	CUGCUGGUUACUCACGAUGTsT	934	CAUCGUGAGUAACCAGCAGTsT	85%	8%
ND-10608	935	GAACAAUUCACCCGUCAACTsT	936	GUUGACGGUGUAAUUGUUCTsT	13%	1%
ND-10609	937	AUUACACCGUCAACAACAATsT	938	UUGUUGUUGACGGUGUAAUTsT	12%	0%
ND-10610	939	CUGUGGUUCCGCCUCCUGGTsT	940	CCGAGGAGCCGAACCACAGTsT	53%	2%
ND-10611	941	GAAGUGCCUUGGCUCACAGTsT	942	GCUGGAGCCAAGGCACUUCTsT	24%	3%
ND-10612	943	GAUCAGCCAAGCGAAACUUTsT	944	AAGUUUCGCUUGGCUGAUCTsT	12%	0%
ND-10613	945	AGAAAACCGCUGAUAAACCAGTsT	946	CUGGUUAUCAGCGGUUCUTsT	12%	1%
ND-10614	947	UGAUAAACCAGGACAAAACATsT	948	UGUUUUGUCCUGGUUAUCATsT	7%	1%
ND-10615	949	CACGCAGGCAUGCACGGGUTsT	950	ACCCGUGCAUGCCUGCGUGTsT	12%	0%
ND-10616	951	GCUCUCCAGUAGCACAGAUTsT	952	AUCUGUGCUACUGGAGAGTsT	9%	1%
ND-10617	953	CAGACCCGGUAAGUAAAGTsT	954	CUUUACUUAACCCGGGUCUGTsT	55%	3%
ND-10618	955	AGACCCGGGUAAGUAAAGTsT	956	CCUUUACUUACCCGGGUCUTsT	72%	8%
ND-10619	957	AUCACUCCGCCUUCUCCUGTsT	958	CAGGAGAAGCCGGAGUGAUTsT	63%	6%
ND-10620	959	CACUCGCCUUCUCCUGGGTsT	960	CCCAGGAGAAGCCGGAGUGTsT	28%	1%
ND-10621	961	AACUAGACUGUAAGUGCCUTsT	962	AGGCACUUACAGUCUAGUUTsT	23%	1%
ND-10622	963	UAUGCUCCAUGUCUAGCCCTsT	964	GGGCUAGACAUGGAGCAUATsT	98%	2%
ND-10623	965	CCCGAUGUAUGGAAACUGTsT	966	GCAGUUUCCAUAUCAUCGGTsT	11%	1%
ND-10624	967	GUACUGCUACUAUAAGCUCTsT	968	GAGCUUAUAGUAGCAGUACTsT	19%	1%
ND-10625	969	AGCGUGACCAGCUACCAGTsT	970	GCUGGUAGCUGGUCACGCUTsT	49%	2%
ND-10626	971	ACAAUUCACCCGUCAACAATsT	972	UUGUUGACGGUGUAAUUGUTsT	8%	0%
ND-10627	973	AUGCUCUCCUGGUGGGAGTsT	974	CCUCCCACCAGAGGAGCAUTsT	76%	5%
ND-10628	975	AACAGUAGCUGAUGAAGCUTsT	976	AGCUUCAUCAGCUACUGUUTsT	22%	1%
ND-10629	977	CUGACUCCCGAGGGCUAGTsT	978	CCUAGCCCUCCGGAGUCAGTsT	34%	2%
ND-10630	979	GUGCAACCAGAACAAUCGTsT	980	CGAUUUGUUCUGGUUGCACTsT	10%	1%
ND-10631	981	UGCAACCAGAACAAUCCGTsT	982	CCGAUUUGUUCUGGUUGCATsT	48%	4%
ND-10632	983	CUUCAAGUACACACAGCATsT	984	UGCUGUGUGUACUUUGAAGTsT	20%	1%
ND-10633	985	CAGCGUGACCAGCUACCAGTsT	986	CUGGUAGCUGGUCACGCUCTsT	35%	1%
ND-10634	987	AGAACAAUUCACCCGUCAATsT	988	UUGACGGUGUAAUUGUUCUTsT	14%	0%
ND-10635	989	GAUAACCAGGACAAAACACTsT	990	GUGUUUUGUCCUGGUUAUCTsT	11%	1%
ND-10636	991	ACAACCAAGGGUACACGCATsT	992	UGCGUGUACCCUUGGUUGUTsT	17%	1%

ND-10637	993	CCCAGCGACGGCUUAGCCTsT	994	GGCUUAAGCCGUCGCGUGGTsT	27%	2%
ND-10638	995	CUCCCAGGGCUAGGGCUATsT	996	UAGCCCUAGCCUCGGGAGTsT	23%	1%
ND-10639	997	UAGAACCCUGUCUAGACACTsT	998	GUGUCUGAGCAGGGUUCUATsT	35%	2%
ND-10640	999	CCUGGGCUGUUUACCAAGTsT	1000	CUUGGUGAAACAGCCCAGGTsT	14%	1%
ND-10641	1001	GGAU CAGCCAAGCGAAACUTsT	1002	AGUUUCGCUUGGCUGAUCCTsT	16%	3%
ND-10642	1003	AAGAAACCGUGAUAAACCATsT	1004	UGGUUAUCAGCGGUUUCUUTsT	17%	1%
ND-10643	1005	ACCAAGGGUACACGCAGGCTsT	1006	GCCUGCGUGUACCCUUGGUTsT	37%	4%
ND-10644	1007	GUAGCACAGAUGUCUGCUCTsT	1008	GAGCAGACAUCUGUGCUACTsT	13%	3%
ND-10645	1009	UUUCAUACCUCUACAUGUCTsT	1010	GACAUGUAGAGGUAUGAAATsT	88%	8%
ND-10646	1011	CCAACCAUCUGCCAGAGAATsT	1012	UUCUCUGGCAGAUUGGUUGTsT	16%	2%
ND-10647	1013	GUCAGGGACUGAAUCUUGCTsT	1014	GCAAGAUUCAGUCCUGACTsT	16%	3%
ND-10648	1015	AGCAUGAUC AAGGAGUGTsT	1016	CACACUCCUUGAUC AUGCUTsT	50%	7%
ND-10649	1017	GCAGCGUGACCAGCUACCATsT	1018	UGGUAGCUGGUCACGCUGCTsT	40%	6%
ND-10650	1019	CAGCUCUCUGCGUUGUACUTsT	1020	AGUAAACCAGCAGAGAGCUGTsT	56%	5%
ND-10651	1021	GUUCGGCUCUCGGUGUUGTsT	1022	CAACACCGAGGAGCCGAACTsT	68%	5%
ND-10652	1023	GCAGAUGCUCUCUGGUGTsT	1024	CCACCAGAGGAGCAUCUGCTsT	26%	5%
ND-10653	1025	AGGAAGUUGCUCCAAGAACTsT	1026	GUUCUUGGAGCAACUUCCTsT	18%	2%
ND-10654	1027	AACGCUUCUGCCACAUCUUTsT	1028	AAGAUUGGGCAGAAGCGUUTsT	18%	1%
ND-10655	1029	CACCUGGGCUGUUUACCATsT	1030	UGGUGAAACAGCCAGGUGTsT	17%	2%
ND-10656	1031	AAGCCAU GCAGCGUGACCATsT	1032	UGGUCACGCUGCAUGGCUUTsT	27%	3%
ND-10657	1033	CGAGGGCUAGGGCUAGAGCTsT	1034	GCUCUAGCCCUAGCCUCGTsT	30%	1%
ND-10658	1035	GGAAACCCUGGACAGACUUTsT	1036	AAGUCUGUCCAGGGUUUCCTsT	14%	1%
ND-10659	1037	GUAGCUGAUGAAGCUGCCCTsT	1038	GGGCAGCUUCAUCAGCUACTsT	19%	1%
ND-10660	1039	UCUUUUUCCCUUGGAUCAGTsT	1040	CUGAUCCAAGGGAAAAAGATsT	88%	4%
ND-10661	1041	CUCCAGUAGCACAGAUGUCTsT	1042	GACAUUCUGUCUACUGGAGTsT	10%	1%
ND-10662	1043	CCAAAUUGAUCACUCCGCTsT	1044	GCGSAGUGAUC AAUUUGGTsT	25%	3%
ND-10663	1045	CAGACCACCGGGCUGUUTsT	1046	AAACAGCCCAGGUGGUCUGTsT	24%	2%
ND-10664	1047	CCCUUCCCAACUAGACUGUTsT	1048	ACAGUCUAGUUGGGAAGGTsT	15%	2%
ND-10665	1049	CGCAGCCGUCGCGACCUUGCTsT	1050	GCAGGUCGCGACGGCUGCGTsT	45%	2%
ND-10666	1051	UUCUCACACCAAGGCAGAUTsT	1052	AUCUGCCUUGGUGAGAAATsT	25%	2%

ND-10667	1053	CACCACCAUCCACGGCGCCtT	1054	GGGCGCGÚGGAUUGGUGGUGtT	35%	3%	2ª selección de dosis única a 50 nm en h441; MV	DE
						4%		
ND-10668	1055	CCAUUACUUUUUGUAACGCTtT	1056	GCGUUCACAAAAGUAUUGGtT	19%		16%	2%
ND-10669	1057	CCAAGAACAGUAGCUGAUGtT	1058	CAUCAGCUACUGUUCUUGGtT	23%	4%	17%	1%
ND-10670	1059	AGGAGAGGUUUCACACCTtT	1060	GGUGUGAGAAACCUCCUCtT	18%	3%	24%	2%
ND-10671	1061	AUCAUCCUGCUUGGAGCAAtT	1062	UUGCUCCAAGCAGGAUGAUtT	33%	3%	27%	4%
ND-10672	1063	GCAUCACAGAGCAGACGCtT	1064	AGCGUCUGCUCUGUGAUGCTtT	29%	2%	61%	3%
ND-10673	1085	AGGAGGUAGCCUCCACCCtT	1086	AGGGUGGAGGCUACCCUCtT	63%	6%		
ND-10674	1067	ACAACCGCAUGAAGACGGCTtT	1068	GCCGUCUUAUGCGGUUGtT	94%	2%	18%	1%
ND-10675	1069	GCAUGAAGACGGCCUUCUGtT	1070	CAGAAGGCCGUCUUAUGCTtT	20%	2%	60%	4%
ND-10676	1071	GUCACGAUGGUCACCCUCCtT	1072	GGAGGGUGACCAUCGUGACTtT	66%	5%	18%	1%
ND-10677	1073	CCCUGCU CAGACACCAUUA tT	1074	UAAUGGUGUCUGAGCAGGGtT	15%	3%		
ND-10678	1075	UCACGAUGGUCACCCUCCtT	1076	AGGAGGUGACCAUUGUGAtT	80%	6%	70%	4%
ND-10679	1077	UCAACCUCAACTCGGACAAtT	1078	UUGUCOGAGUUGAGGUGAtT	20%	3%	21%	1%
ND-10680	1079	UGACCAGCUACCAGCUCtT	1080	GAGAGCUGGUAGCUGGUCAtT	88%	22%	77%	5%
ND-10681	1081	GAUGGCCUCGGUGACAUCtT	1082	GAUGUCACCGAGGGCCAUCtT	88%	18%	60%	4%
ND-10682	1083	GCUUUGACAAGGAACUUCtT	1084	GAAAGUUCUUGUCAAGCTtT	19%	7%	14%	2%
ND-10683	1085	CGAUACUGGUCUCCAGGCtT	1086	GGCCUGGAGACCAGUAUCGtT	27%	5%	27%	2%
ND-10684	1087	UCUGGAUGUCUCCAUGCCTtT	1088	GGCAUGGAAGACAUCCAGAtT	92%	13%	89%	3%
ND-10685	1089	CAGGACCCUAGACCUCUGCTtT	1090	GCAGAGGUCUAGGGUCCUGtT	58%	14%	50%	2%
ND-10686	1091	GACCCUAGACCUCUGCAGCTtT	1092	GCUGCAGAGGUCUAGGGUCtT	27%	2%		
ND-10687	1093	ACCCUAGACCUCUGCAGCCTtT	1094	GGCUGCAGAGGUCUAGGGUtT	21%	1%		
ND-10688	1095	CAGCCACGGCGGAGGAGGtT	1096	CCUCCUCCGCCGUGGGCUGtT	55%	4%		
ND-10689	1097	CUCUUCGAGUUCUUCUGCATtT	1098	UGCAGAAGAACUCGAAGAGtT	13%	3%		
ND-10690	1099	UUGGCAUGAUGUACUGGCAtT	1100	UGCCAGUACAUCAUGCCAAtT	16%	2%		

ND-10691	1101	GGCAUGAUGUACUGGCAAUTsT	1102	AUUGCCAGUACAUCAUGCCTsT	13%	1%
ND-10692	1103	UGUACUGGCAAUUCGGCCUTsT	1104	AGGCCGAAUUGCCAGUACATsT	45%	2%
ND-10693	1105	ACUGGCAAUUCGGCCUGCUTsT	1106	AGCAGGCCGAAUUGCCAGUTsT	38%	3%
ND-10694	1107	GGCAAUUCGGCCUGCUUUUTsT	1108	AAAAGCAGGCCGAAUUGCCTsT	10%	1%
ND-10695	1109	CAAUUCGGCCUGCUUUUCGTsT	1110	CGAAAAGCAGGCCGAAUUGTsT	12%	1%
ND-10696	1111	UCGGAGAGUACUUCAGCUATsT	1112	UAGCUGAAGUACUCUCCGATsT	12%	1%
ND-10697	1113	CAACAUCUGUCGAGGCUGTsT	1114	CAGCCUCGACAGGAUGUUGTsT	35%	7%
ND-10698	1115	CAUCCUGUCGAGGCUGCCATsT	1116	UGGCAGCCUCGACAGGAUGTsT	26%	6%
ND-10699	1117	UCCUGCAACCAGGCCGAAUTsT	1118	AAUUCGCCUGGUUGCAGGATsT	28%	6%
ND-10700	1119	GGAAACUGCUAUACUUUCATsT	1120	UGAAAGUADAGCAGUUUCCTsT	7%	2%
ND-10701	1121	ACGGUCUGUCCUGAUGCUTsT	1122	AGCAUCAGGGACAGACCGUTsT	28%	7%
ND-10702	1123	GGUCUGUCCUGAUGCUGCTsT	1124	GCAGCAUCAGGGACAGACCTsT	33%	2%
ND-10703	1125	GGCCCGGGUAAUGGUGCACTsT	1126	GUGCACC AUUACCCGGGCTsT	47%	10%
ND-10704	1127	CAGGAUGAACCCUGCCUUATsT	1128	UAAAGGCAGGUUCAUCCUGTsT	59%	2%
ND-10705	1129	GAUGAACCCGCUUUAUGGTsT	1130	CCAUAAGGCAGGUUCAUCTsT	77%	7%
ND-10706	1131	GGUGGCUUUAACUUGCGGCTsT	1132	GCCGCAAGUUAAGCCACTsT	47%	8%
ND-10707	1133	GUGGCUUUAACUUGCGGCTsT	1134	GGCCGCAAGUUAAGCCACTsT	17%	2%
ND-10708	1135	UUCGGCCUGGCGUGGAGATsT	1136	UCUCCAGCCAGGCCGCAATsT	52%	3%
ND-10709	1137	UGGCGCCUGGCGUGGAGACTsT	1138	GUCUCCAGCCAGGCCGATsT	81%	4%
ND-10710	1139	GCGGCCUGGCGUGGAGACTsT	1140	GGUCUCCAGCCAGGCCGCTsT	57%	4%
ND-10711	1141	CAGGUGUGUAUUCACUCCTsT	1142	AGGAGUGAAUACACACCTsT	24%	2%
ND-10712	1143	GUGUAUUCACUCCUGCUUCTsT	1144	GAAGCAGGAGUGAAUACACTsT	20%	1%
ND-10713	1145	GGCCUCCGUGACAUCCATsT	1146	UGGGAUGUCACCGAGGGCTsT	40%	3%
ND-10714	1147	GAUGCUAUCGCGACAGAACTsT	1148	GUUCUGUCGCGAUAGCAUCTsT	24%	2%
ND-10715	1149	ACUACAAAACCAAUUCUGATsT	1150	UCAGAAUUGGUUUUGUAGUTsT	19%	2%
ND-10716	1151	CAAUUCUGAGUCUCCUCUTsT	1152	AGAGGGAGACUCAGAAUUGTsT	35%	3%
ND-10717	1153	CUCUGUCACGAUGGUCACCTsT	1154	GGUGACCAUCGUGACAGAGTsT	41%	4%
ND-10718	1155	CUGCUCCGAAGGUUCCGAATsT	1156	UUCGGAACCUUCGGAGCAGTsT	16%	3%
ND-10719	1157	AGGUUCCGAAGCCGAUACUTsT	1158	AGUAUCGGCUUCGGAACCUtsT	16%	2%
ND-10720	1159	GUUCCGAAGCCGAUACUGGTsT	1160	CCAGUAUCGGCUUCGGAACtsT	21%	2%
ND-10721	1161	CGAAGCCGAUACUGGUCUCTsT	1162	GAGACCAGUAUCGGCUUCGTsT	16%	1%
ND-10722	1163	AAGAUUGAAGGAUGUGCAGTsT	1164	CUGCACAUCCUUCAUCUUTsT	25%	2%

ND-10723	1165	GAUUGAAGGAUGUGCAGGGTsT	1166	CCCUGCACAUCUCAAUCTsT	26%	1%
ND-10724	1167	UGCCUCUGAACACUCUGGUTsT	1168	ACCAGAGUGUUCAGAGGCATsT	45%	3%
ND-10725	1169	CCUCUGAACACUCUGGUUUTsT	1170	AAACCAGAGUGUUCAGAGGTsT	15%	2%
ND-10726	1171	GACAAGGAACUUUCCUAAGTsT	1172	CUUAGGAAAGUUCUUGUCTsT	105%	14%
ND-10727	1173	CAGGACAAAACACAACCAATsT	1174	UUGGUUGUGUUUGUCCUGTsT	32%	5%
ND-10728	1175	AACACAACCAAGGGUACACTsT	1176	GUGUACCCUUGGUUGUGUUTsT	60%	13%
ND-10729	1177	UUGAACUUGGGUGGGAAACTsT	1178	GUUUCCACCCAAGUUCATsT	23%	8%
ND-10730	1179	UGAACUUGGGUGGGAAACCTsT	1180	GGUUUCCACCCAAGUUCATsT	18%	4%
ND-10731	1181	ACCCGUGCCUCACAGAGCTsT	1182	GCUCUGUGAGGGCAOGGUTsT	19%	1%
ND-10732	1183	ACTUAUAACAUUCGUGGAGTsT	1184	CUCCAGCAGAUUUUAUAGUTsT	17%	5%
ND-10733	1185	AUCUGCUGGAGUGUUGCUGTsT	1186	CAGCAACACUCCAGCAGAUTsT	119%	20%
ND-10734	1187	CUCUGGAGUGUUGCUGUUTsT	1188	AACAGCAACACUCCAGCAGTsT	58%	13%
ND-10735	1189	CUAGCCCAUCAUCCUGCUUTsT	1190	AAGCAGGAUGAUGGGCUAGTsT	20%	6%
ND-10736	1191	CUCUGGAUGUCUCCAUGCTsT	1192	GCAUGGAAGACAUCAGAGTsT	28%	8%
ND-10737	1193	AGCAGGACCCUAGACCUCUTsT	1194	AGAGGUCUAGGGUCCUGCUTsT	36%	2%
ND-10738	1195	UUCGAGUUCUUCUGCAACATsT	1196	UGUUGCAGAAGAACUCGAATsT	13%	1%
ND-10739	1197	CACCAUCCACGGCGCCAUCTsT	1198	GAUGGCGCCUGGAUGGUTsT	13%	2%
ND-10740	1199	CCACGGCGCCAUCGCCUGTsT	1200	CAGGCGGAUGGCGCCUGGTsT	44%	4%
ND-10741	1201	CAGCACAACCGCATGAAGATsT	1202	UCUUCAUCCGGUUGUGCUGTsT	23%	3%
ND-10742	1203	CCUUUGGCAUGAUGUACUGTsT	1204	CAGUACAUCAUGCCAAAGTsT	12%	1%
ND-10743	1205	AUCCUGUCGAGGCGGCCAGTsT	1206	CUGGCAGCCUCGACAGGATsT	14%	3%
ND-10744	1207	UCUCCUGCAACCAGGCGAATsT	1208	UUCGCCUUGGUUGCAGGAGATsT	12%	1%
ND-10745	1209	UGCAAACCAGGCGAAUUACTsT	1210	AGUAAUUCGCCUGGUUGCATsT	45%	5%
ND-10746	1211	ACCUCAUCAGCAUGAGGATsT	1212	UCCUCAUGCUGAUGGAGGUTsT	82%	7%
ND-10747	1213	GCGACUGCACCAAGAAUGTsT	1214	CCAUUCUUGGUGCAGUCGCTsT	82%	19%
ND-10748	1215	ACCAAGAUAUGGCAGUGAUGTsT	1216	CAUCACUGCCAUUCUUGGUTsT	54%	18%
ND-10749	1217	UGGUUACUCACGAUGGCCCTsT	1218	GGCCCAUCGUGAGUAACCATsT	45%	7%
ND-10750	1219	AGAAAUGGAGUGGCCAAAGTsT	1220	CUUUGGCCACUCCAUUUCUTsT	11%	3%
ND-10751	1221	GGAGCUGAACUACAAAACCTsT	1222	GGUUUUGUAGUUCAGCUCTsT	15%	3%
ND-10752	1223	CCUCUGUCACGAUGGUCACTsT	1224	GUGACCAUCGUGACAGAGTsT	18%	5%
ND-10753	1225	AGAUUGAAGGAUGUGCAGGTsT	1226	CCUGCACAUCUCAAUCUTsT	26%	3%
ND-10754	1227	GAGCUUUGACAAGGAACUUTsT	1228	AAGUUCUUGUCAAGCUCTsT	14%	2%

ND-10755	1229	CUUUGACAAGGAACUUUCCTsT	1230	GGAAAGUCCUUGUCAAGTsT	50%	8%
ND-10756	1231	UCAGACACCAUUAUUUGTsT	1232	CAAAGUAAUGGUGUCUGATsT	32%	4%
ND-10757	1233	AGCACACUAUAACAUCUGCTsT	1234	GCAGAUGUUUAUGUGGUCUTsT	11%	2%
ND-10758	1235	GCACAACOGCAUGAAGACGTsT	1236	CGUCUUAUGCGGUUGUGCTsT	34%	3%
ND-10759	1237	ACUGCUUCUACCAGACAUATsT	1238	UAUGUCUGGUAGAAGCAGUTsT	11%	1%
ND-10760	1239	GAAGACGGCCUUCUGGGCATsT	1240	UGCCCAGAAGGCCGUCUUCTsT	16%	2%
ND-10761	1241	AAGACGGCCUUCUGGGCAGTsT	1242	CUGCCCAGAAGGCCGUCUUTsT	58%	21%
ND-10762	1243	ACAUCAACCUCAACUCGGATsT	1244	UCCGAGUUGAGGUUGAUGTsT	14%	3%
ND-10763	1245	UGGAAGGACUGGAAGAUUGTsT	1246	CGAUCUUCAGUCCUCCATsT	109%	29%
ND-10764	1247	ACAUCUGUGCGAGGCUGCCTsT	1248	GGCAGCCUCGACAGGAUGTsT	101%	13%
ND-10765	1249	CAACCAGCCGAAUUAUCUTsT	1250	AGAGUAAUUCGCCUGGUUGTsT	19%	5%
ND-10766	1251	CAGGCGAAUUAUCUCACUTsT	1252	AGUGAGAGUAAUUCGCCUGTsT	24%	4%
ND-10767	1253	AGCAGAAUGACUUAUUCCTsT	1254	GGAAUGAAGUCAUUCUGCUTsT	40%	8%
ND-10768	1255	AUGAUGGUGGCUUUAACUUTsT	1256	AAGUUAAGGCCACCAUCAUTsT	85%	8%
ND-10769	1257	AGAACCUUUAACCUUCAATsT	1258	UUUGAAGGGUAAAGGUUCUTsT	22%	4%
ND-10770	1259	CCUUUACCCUCAAAGUACTsT	1260	GUACUUUGAAGGGUAAAGTsT	21%	4%
ND-10771	1261	GAGCCUGUGGUUCGGUCCTsT	1262	GGAGCCGAACCACAGGCUCTsT	28%	1%
ND-10772	1263	UGGUACUGCCUCUGAACACTsT	1264	GUGUUCAGAGGCAGUACCATsT	58%	4%
ND-10773	1265	CUCAUACCCUGGCCUACTsT	1266	GUGAGGGCACGGUUAUGAGTsT	15%	2%
ND-10774	1267	CCGUAGCACACUAUAACAUTsT	1268	AUGUUAUJAGUGUCUACGCTsT	24%	6%
ND-10775	1269	CGUAGCACACUAUAACAUCTsT	1270	GAUGUUAUJAGUGUCUACGTsT	21%	4%
ND-10776	1271	GCAGGACCCUAGACCUCUGTsT	1272	CAGAGGUCUAGGGUCCUGCTsT	25%	4%
ND-10777	1273	GCCUGCUUUUCGGAGAUATsT	1274	UACUCUCCGAAAAGCAGGCTsT	18%	4%
ND-10778	1275	GGGCCCGGGUAAUGGUGCATsT	1276	UGCACCAUUAACCGGGCCCTsT	16%	2%
ND-10779	1277	CAACAACAAGAGAAUUGGATsT	1278	UCCAUUUCUCUUGUUGUUGTsT	17%	0%
ND-10780	1279	GCUGUUGCACCAUACUUCUTsT	1280	GAAAGUAUGGUGCAACAGCTsT	14%	1%
ND-10781	1281	CUACCGAGAGCUUCUGAGTsT	1282	CUGGAAGAGCUCUGGUAGTsT	24%	3%
ND-10782	1283	ACCUGCCUUUAUGGAUGAUTsT	1284	AUCAUCCAUAAAGGCAGGUTsT	115%	10%
ND-10783	1285	UUGACAAGGAACUUUCCUATsT	1286	UAGGAAAGUUCUUGUCAATsT	16%	1%
ND-10784	1287	GCUGGAGUGUUGCUGUGCTsT	1288	GCAACAGCAACACUCCAGCTsT	12%	1%
ND-10785	1289	UCGGUGACAUCCAGGAAUTsT	1290	AUCCUGGGAUGUCACCGATsT	26%	1%
ND-10786	1291	GCUGCCAGAAUGGUCUUGTsT	1292	CAAGGCACUUCUGGGCAGCTsT	15%	2%
ND-10787	1293	AGUACACACAGCAGGUGUGTsT	1294	CACACCUGCUGUGUACUTsT	12%	1%
ND-10788	1295	CAAGUGCCGGAAGCCAUGCTsT	1296	GCAUGGCUUCGGCACUUGTsT	94%	2%

Tabla 1C: ARNiC seleccionados en el conjunto sustituto de rata *in vivo* (ARNiC que presentan reactividad cruzada entre ser humano-rata con la especificidad más alta en rata). Se identificó un conjunto de selección de 48 secuencias de ARNi de alfa-ENaC que presentan reactividad cruzada entre ser humano y rata. Se muestra la expresión residual en porcentaje de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de una única dosis independientes (se hace referencia a la sección de ejemplos para los métodos usados).

5

ID de dúplex	ID de sec.	Sentido	ID de sec.	Antisentido	1ª selección de una única dosis a 50 nM en H441; MV	DE	2ª selección a 50 nM en H441	DE
ND-9201	1297	uGUGcAAccAGAACAAUcTsT	1298	GAUUUGJUCUGGUUGcAcATsT	8%	1%	8%	1%
ND-9202	1299	uuuAuGGAuGAUGGuGGcuTsT	1300	AGCcACcAUcAUcCAuAAATsT	80%	9%	82%	6%
ND-9203	1301	GccuuuAuGGAuGAUGGuTsT	1302	cACcAUcAUcCAuAAAGGCTsT	76%	8%	76%	2%
ND-9204	1303	cAcAAccGcAuGAAGAcGGTsT	1304	CCGUCUcAUcCGGUUGUGTsT	73%	18%	57%	3%
ND-9205	1305	AccGcAuGAAGAcGGccuuTsT	1306	AAGCCCGUCUcAUcCGGUTsT	35%	3%	37%	2%
ND-9206	1307	AGGAcuGGAAGAcGGcuTsT	1308	AAGCCGAUCUcCAGUCCUcTsT	17%	3%	16%	3%
ND-9207	1309	GAAGGAcUGGAAGAcGGcTsT	1310	GCOGAUCUcCAGUCCUcTsT	96%	18%	81%	5%
ND-9208	1311	GGAcuGGAAGAcGGcuTsT	1312	GAAGCCGAUCUcCAGUCCUcTsT	58%	6%	57%	3%
ND-9209	1313	AGuuccAccGcuccuAccTsT	1314	CGGAGGAGCGGUGGAACUcTsT	85%	8%	94%	4%
ND-9210	1315	GAcuGGAAGAcGGcuTsT	1316	GGAAGCCGAUCUcCAGUcTsT	79%	5%	82%	2%
ND-9211	1317	cGcAuGAAGAcGGcuTsT	1318	AGAAGCCCGUCUcAUcCGTsT	50%	1%	51%	1%
ND-9212	1319	GcAGuGGAGccuGuGGuuTsT	1320	AACcAcAGGCUcCAGUCCUcTsT	26%	3%	23%	2%
ND-9213	1321	uGccuuuAuGGAuGAUGGuTsT	1322	ACcAUcAUcCAuAAAGGcATsT	77%	5%	76%	4%
ND-9214	1323	uccuGuccAAccuGGcAGTsT	1324	CUGCCcAGGUUGAcAGGATsT	74%	9%	83%	6%
ND-9215	1325	AGGGAGuGGuAccGcuuccTsT	1326	GGAAGCGGuACCACUCCUcTsT	79%	6%	89%	4%
ND-9216	1327	GGcuGuGccuAcAuucuuTsT	1328	AGAAGAUcAGGcAcAGCCTsT	11%	1%	13%	1%
ND-9217	1329	GAuuuAAAGAGGAGcuGGTsT	1330	CcAGCUCUcUuuAAUUUcTsT	84%	14%	78%	5%
ND-9218	1331	AcuGGAGAcuGGcuuccATsT	1332	UGGAAGCCGAUCUcCAGUcTsT	50%	4%	55%	3%
ND-9219	1333	ccuGuccAAccuGGcAGcTsT	1334	GCUGCCcAGGUUGGAcAGTsT	78%	6%	85%	5%
ND-9220	1335	ccuGccuuuAuGGAUGAuTsT	1336	cAUcAUcCAuAAAGGcAGTsT	76%	5%	77%	9%
ND-9221	1337	AAccGcAuGAAGAcGGcuTsT	1338	AGGCCGUCUcAUcCGGUUcTsT	79%	8%	66%	3%
ND-9222	1339	uGuccAAccuGGcAGccATsT	1340	UGGCUGCCcAGGUUGGAcATsT	70%	4%	57%	4%
ND-9223	1341	GuccAAccuGGcAGccATsT	1342	CUGGCUGCCcAGGUUGGAcATsT	95%	10%	76%	4%
ND-9224	1343	AAuuuAAAGAGGAcuGGATsT	1344	UCcAGCUcCUCUuuAAUUUcTsT	83%	6%	69%	2%
ND-9225	1345	GGAAGGAcuGGAAGAcGGTsT	1346	CCGAUCUcCAGUcCUcCCTsT	41%	2%	30%	2%
ND-9226	1347	GuGAGGGAGUGGuAccGcuTsT	1348	AGCGGuAcCACUCCUcACTsT	21%	1%	17%	0%
ND-9227	1349	AcuuuCAuGAcAAGAcATsT	1350	UGUUCUUGcAUUGAAAGUcTsT	13%	1%	10%	0%
ND-9228	1351	uCAAuGAcAAGAcAAcucTsT	1352	GAGUUGUcUUGUcAUUGATsT	36%	2%	28%	0%
ND-9229	1353	cuuuAuGGAUGAuGGcTsT	1354	GCcACcAUcCAuAAAGTsT	24%	1%	20%	1%
ND-9230	1355	GccuGGcGuGGAGAccuTsT	1356	GGAGGUCUcCAGCCcAGGCTsT				
ND-9231	1357	uGccGuGGAGAccuccuTsT	1358	GAUGGAGGUcUcCAGCCcATsT	45%	4%	35%	2%
ND-9232	1359	GAGuuccAccGcuccuAccTsT	1360	GGuAGGAGCGGUUGGAcUcTsT	89%	4%	86%	8%
ND-9233	1361	cAGAGcAGAAuGAcuucAuTsT	1362	AUGAAGUcAUcUGCUCUGTsT	21%	1%	17%	0%
ND-9234	1363	uuAcuuccuGcuuccAGGATsT	1364	UCCUGGAAGcAGGAGUGAATsT	85%	4%	74%	6%
ND-9235	1365	uAcuuccuGcuuccAGGATsT	1366	CUCUGGAAGcAGGAGUGATsT				
ND-9236	1367	cuGuGcAAcCAGAAcAAuTsT	1368	AUUUGUUCUGGUUGcAcAGTsT	23%	1%	17%	2%
ND-9237	1369	cuGcAAcAAcAccAucTsT	1370	GAUGGUGGUUGUUGcAGTsT	34%	2%	27%	2%
ND-9238	1371	uGUGGcuGuGccuAcAuTsT	1372	AGAUGAGGcAcAGCCAcATsT	86%	4%	73%	10%
ND-9239	1373	uGccuGuGccuAcAuTsT	1374	GAAGAUUGAGGcAcAGCCAcATsT	68%	6%	53%	4%
ND-9240	1375	cuGuccAAccuGGcAGccTsT	1376	GGCUGCCcAGGUUGGAcAGTsT	80%	5%	73%	9%
ND-9241	1377	ccuGcuGuccAcAGUGAcTsT	1378	GUcCUGUGGAcAGcAGGGTsT	83%	5%	71%	5%
ND-9242	1379	CcAGccAGuGGAGccuGuTsT	1380	cAcAGGCUcCAGUCCUcTsT	105%	9%	90%	5%
ND-9243	1381	uuCAAuGAcAAGAAcAAcTsT	1382	AGUUGUUCUUGUcAUUGAATsT	23%	3%	21%	1%
ND-9244	1383	cuGccuuuAuGGAUGAuTsT	1384	CcAUcAUcCAuAAAGGcAGTsT	74%	6%	64%	7%
ND-9245	1385	AAuGAcAAGAAcAAcucTsT	1386	UGGAGUUGUUCUUGUcAUUcTsT	21%	1%	21%	1%
ND-9246	1387	uGGGcAGccAGuGGAGccuTsT	1388	AGGCUCcACUGGUcGCCAcTsT	83%	3%	73%	2%
ND-9247	1389	cuuccuGuccAAccuGGcATsT	1390	UGCCcAGGUUGGAcAGGAGTsT	86%	3%	84%	1%
ND-9248	1391	GGcGuGGAGAccuccuAcTsT	1392	UGAGGAGGUUCcACGCCcTsT	92%	4%	88%	3%

Tabla 1D: ARNiC seleccionados en el conjunto sustituto de cobaya *in vivo* (ARNiC que presentan reacción cruzada entre ser humana-cobaya): Se identificaron un conjunto de selección de 63 secuencias de ARNi de alfa-ENaC que presentan reacción cruzada entre ser humano y cobaya y se sintetizaron, tanto con (hebras de secuencias 1393-1518) como sin (hebras de secuencias 1519-1644) modificación de la estructura principal. Se muestra la expresión residual en porcentaje de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de una única dosis independientes (se hace referencia a la sección de ejemplos para los métodos usados).

ID de dúplex	ID de sec.	Sentido	ID de sec.	Antisentido	1ª selección de una única dosis a 50 nM en H441; MV	DE	2ª selección a 50 nM en H441	DE
ND8437	1393	AAucGGAcuGcuucuAccATsT	1394	UGGuAGAAGcAGUCOGAUUTsT	48%	7%	46%	5%
ND8438	1395	AucGGAcuGcuucuAccAGTsT	1396	CUUGuAGAAGcAGUCOGAUUTsT	85%	5%	93%	13%
ND8439	1397	AAaucGGAcuGcuucuAccTsT	1398	GGuAGAAGcAGUCCGAUUUTsT	36%	3%	42%	6%
ND8440	1399	ucGGAcuGcuucuAccAGATsT	1400	UCUGGuAGAAGcAGUCCGATsT	45%	3%	50%	4%
ND8441	1401	AccAGAAcAAaucGGAcuGTsT	1402	cAGUCOGAUUUUGUCUGGUTsT	23%	3%	24%	6%
ND8442	1403	ccAGAAcAAaucGGAcuGcTsT	1404	GcAGUCCGAUUUGUCUGGTsT	50%	6%	39%	9%
ND8443	1405	cAGAAcAAaucGGAcuGcuTsT	1406	AGcAGUCOGAUUUUGUCUGTsT	22%	2%	24%	1%
ND8444	1407	cuucGccuGccGcuucAAcTsT	1408	GUUGAAGCGGcAGGCGAAGTsT	111%	8%	109%	4%
ND8445	1409	uGGuAccGcuuccAcuAcATsT	1410	UGuAGUGGAAGCGGuACcATsT	84%	7%	97%	13%
ND8446	1411	AucuucGccuGccGcuucATsT	1412	UGAAGCGGcAGGCGAAGAUtsT	90%	3%	121%	13%
ND8447	1413	uucGccuGccGcuucAAcTsT	1414	GGUUGAAGCGGcAGGCGAATsT	92%	2%	105%	17%
ND8448	1415	cAccucAAucccuAcAGTsT	1416	CCUGuAGGGAUUGAGGGUGTsT	79%	3%	90%	13%
ND8449	1417	AGAAcAAaucGGAcuGcuTsT	1418	AAGcAGUCCGAUUUGUCUTsT	11%	0%	17%	3%
ND8450	1419	GAAcAAaucGGAcuGcuTsT	1420	GAAGcAGUCOGAUUUUGUCUTsT	21%	1%	30%	5%
ND8451	1421	cGGAcuGcuucuAccAGAcTsT	1422	GUCUGGuAGAAGcAGUCOGTsT	24%	2%	32%	5%
ND8452	1423	AGccuAcAucAAccuAcATsT	1424	UGAGGUUGAUUGUAGGCUTsT	51%	3%	57%	4%
ND8453	1425	GccuAcAucAAccuAcATsT	1426	UUGAGGUUGAUUGUAGGCtsT	16%	1%	26%	3%
ND8454	1427	GucAGccuAcAucAAccTsT	1428	GGUUGAUUGUAGGCUGACTsT	62%	5%	68%	6%
ND8455	1429	ucAGGccuAcAucAAccTsT	1430	AGGUUGAUUGUAGGCUGATsT	77%	4%	87%	6%
ND8456	1431	cAGccuAcAucAAccuAcTsT	1432	GAGGUUGAUUGUAGGCUGTsT	34%	2%	51%	8%
ND8457	1433	GGAGcuGGAccGcAucAcATsT	1434	UGUGAUGCGGUCcAGCUCCTsT	26%	2%	17%	1%
ND8458	1435	GucAccGcuuccAcuAcAucTsT	1436	GAUGuAGUGGAAGCGGuACTsT	101%	9%	99%	11%
ND8459	1437	ccGcuuccAcuAcAucAAcTsT	1438	GUUGAUGuAGUGGAAGCGTsT	85%	8%	80%	6%
ND8460	1439	cGcuuccAcuAcAucAAcATsT	1440	UGUUGAUGuAGUGGAAGCGTsT	56%	6%	48%	3%
ND8461	1441	uuccAcuAcAucAAcAuccTsT	1442	GGAUUGUAGUGuAGUGGAATsT	77%	5%	82%	7%
ND8462	1443	uGGGcAAcuucAucuucGcTsT	1444	GCGAAGAUGAAGUUGCCcATsT	21%	0%	36%	6%
ND8463	1445	GcAAcuucAucuucGccuGTsT	1446	cAGGCGAAGAUGAAGUUGCTsT	80%	4%	84%	13%
ND8464	1447	cAAcuucAucuucGccuGcTsT	1448	GcAGGCGAAGAUGAAGUUGTsT	101%	1%	102%	14%
ND8465	1449	AAcuucAucuucGccuGccTsT	1450	GGcAGGCGAAGAUGAAGUUTsT	100%	4%	95%	12%
ND8466	1451	AcuucAucuucGccuGccTsT	1452	CGGcAGGCGAAGAUGAAGUTsT	51%	4%	49%	5%
ND8467	1453	cuucAucuucGccuGccTsT	1454	GCGGcAGGCGAAGAUGAAGTsT	95%	5%	89%	4%
ND8468	1455	ucAucuucGccuGccGcuTsT	1456	AAGCGGcAGGCGAAGAUGATsT	91%	4%	85%	6%
ND8469	1457	cAucuucGccuGccGcuTsT	1458	GAAGCGGcAGGCGAAGAUGTsT	66%	4%	55%	4%
ND8470	1459	ucuucGccuGccGcuucAAATsT	1460	UUGAAGCGGcAGGCGAAGATsT	97%	2%	99%	11%
ND8471	1461	cGccuGccGcuucAAcAGTsT	1462	CUUGUUGAAGCGGcAGGCGTsT	96%	4%	100%	7%
ND8472	1463	GccuGccGcuucAAcAGTsT	1464	CCUGGUUGAAGCGGcAGGCTsT	90%	4%	82%	5%
ND8473	1465	AuuAcucucAcuuccAccATsT	1466	UGGUGGAAGUGAGAGuAAUTsT	81%	3%	72%	4%
ND8474	1467	uuAcucucAcuuccAccAcTsT	1468	GUGGUGGAAGUGAGAGuAATsT	72%	2%	76%	9%

5

10

ND8475	1469	AcucucAcuuccAccAcccTsT	1470	GGGUGGUGGAAGUGAGAGUTsT	90%	3%	97%	4%
ND8476	1471	ucucGcAcccucAAucccuATsT	1472	uAGGGAUUGAGGGUGcAGATsT	61%	1%	63%	3%
ND8477	1473	cuGcAcccucAAucccuAcTsT	1474	GuAGGGAUUGAGGGUGcAGTsT	74%	3%	73%	1%
ND8478	1475	uGcAcccucAAucccuAcATsT	1476	UGuAGGGAUUGAGGGUGcATsT	98%	4%	85%	1%
ND8479	1477	AcccucAAucccuAcAGGuTsT	1478	ACCUGuAGGGAUUGAGGGUTsT	55%	5%	48%	3%
ND8480	1479	cccucAAucccuAcAGGuATsT	1480	uACCUGuAGGGAUUGAGGGTsT	20%	1%	14%	1%
ND8481	1481	ccucAAucccuAcAGGuAcTsT	1482	GuACCUGuAGGGAUUGAGGTsT	40%	2%	31%	3%
ND8482	1483	AAccAGAAcAAAucGGAcuTsT	1484	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUsT	57%	2%	52%	0%
ND8483	1485	AAcAAucGGAcuGcuucuTsT	1486	AGAAGcAGUCCGAUUUGUUsT	102%	5%	86%	12%
ND8484	1487	AcAAAcuGGAcuGcuucuATsT	1488	uAGAAGcAGUCCGAUUUGUTsT	40%	2%	28%	3%
ND8485	1489	cAAAcuGGAcuGcuucuAcTsT	1490	GuAGAAGcAGUCCGAUUUGTsT	41%	4%	38%	2%
ND8486	1491	GcAcccucAAucccuAcAGTsT	1492	CUGuAGGGAUUGAGGGUGCTsT	91%	7%	94%	4%
ND8487	1493	ccucAAcAcuAAccucAAcTsT	1494	UGuAGGUUGAuGUGAGGTsT	46%	2%	37%	3%
ND8488	1495	cucAAcAcuAAccucAAcTsT	1496	AGUUGAGGUUGAuGUGAGTsT	48%	2%	39%	3%
ND8489	1497	ucAAcAcuAAccucAAcTsT	1498	GAGUUGAGGUUGAuGUGATsT	17%	1%	17%	1%
ND8490	1499	uAccGcuuccAcuAcAucATsT	1500	UGAuGuAGUGGAAGCGGuATsT	90%	5%	74%	8%
ND8491	1501	AccGcuuccAcuAcAucAATsT	1502	UUGAuGuAGUGGAAGCGGUUsT	103%	5%	91%	15%
ND8492	1503	GcuuccAcuAcAucAAcAuTsT	1504	AUGUUGAuGUGGAAGCTsT	85%	5%	71%	10%
ND8493	1505	cuuccAcuAcAucAAcAucTsT	1506	GAUGUUGAuGuAGUGGAAGTsT	60%	5%	45%	3%
ND8494	1507	uccAcuAcAucAAcAuccuTsT	1508	AGGAUGUUGAuGuAGUGGATsT	33%	3%	41%	3%
ND8495	1509	ccAcuAcAucAAcAuccuGTsT	1510	cAGGAUGUUGAuGuAGUGGTsT	60%	5%	55%	2%
ND8496	1511	cuGGcAAcucAucucGTsT	1512	CGAAGAuGAAGUUGCCcAGTsT	18%	0%	20%	0%
ND8497	1513	GGcAAcucAucucGcuTsT	1514	AGCGGAAGAuGAAGUUGCCTsT	76%	1%	77%	2%
ND8498	1515	uucAucucGccuGccGcuTsT	1516	AGCGGcAGGCGAAGAuGAATsT	65%	4%	74%	12%
ND8499	1517	ucGccuGccGcuucAAcATsT	1518	UGGUUGAAGCGGcAGCGATsT	86%	5%	77%	3%
ND-8653	1519	AAUCGGACUGCUUCUACCATsT	1520	UGGUAGAAGCAGUCCGAUUsT	16%	2%	20%	3%
ND-8654	1521	AUCGGACUGCUUCUACCATsT	1522	CUGGUAGAAGCAGUCCGAUUsT	54%	8%	67%	11%
ND-8655	1523	AAAUCCGACUGCUUCUACCTsT	1524	GGUAGAAGCAGUCCGAUUsT	25%	4%	28%	2%
ND-8656	1525	UCGGACUGCUUCUACCATsT	1526	UCUGGUAGAAGCAGUCCGATsT	12%	2%	17%	1%
ND-8657	1527	ACCAGAACAACUGGACUGTsT	1528	GCAGCGAUUUGUUCUGTsT	33%	3%	35%	1%
ND-8658	1529	CCAGAACAACUGGACUGTsT	1530	GcAGUCCGAUUGUUCUGTsT	27%	3%	30%	2%
ND-8659	1531	CAGAACAACUGGACUGTsT	1532	AGCAGUCCGAUUGUUCUGTsT	15%	1%	22%	3%
ND-8660	1533	CUUCGCCUGCCGCUUCACTsT	1534	GUUGAAGCGGcAGGGAAGTsT	69%	17%	75%	10%
ND-8661	1535	UGGUACCGCUUCACUACATsT	1536	UGUAGUGGAAGCGGUACCATsT	16%	2%	20%	3%
ND-8662	1537	AUCUUGCCUGCCGCUUCATsT	1538	UGAAGCGGcAGGGAAGAUUsT	19%	2%	25%	4%
ND-8663	1539	UUCGCCUGCCGCUUCACTsT	1540	GGUUGAAGCGGcAGGGAATsT	90%	4%	97%	10%
ND-8664	1541	CACCCUCAAUCCCUACAGTsT	1542	CCUGUAGGGAUUGAGGGUGTsT	19%	2%	25%	3%
ND-8665	1543	AGAACAACUGGACUGCUUsT	1544	AAGCAGUCCGAUUGUUCUsT	13%	1%	22%	2%
ND-8666	1545	GAACAACUGGACUGCUUsT	1546	GAAGCAGUCCGAUUGUUCUsT	11%	2%	18%	2%
ND-8667	1547	CGGACUGCUUCUACCATsT	1548	GUUGGUAGAAGCAGUCCGsT	13%	1%	16%	2%
ND-8668	1549	AGCCUCAACAUCACCUATsT	1550	UGAGGUUGAuGUGAGGCUUsT	17%	4%	21%	3%
ND-8669	1551	GCCUCAACAUCACCUATsT	1552	UUGAGGUUGAuGUGAGGCUUsT	13%	1%	21%	3%
ND-8670	1553	GUCAGCCUCAACAUCACCTsT	1554	GGUUGAuGUGAGGCUUGACTsT	43%	11%	27%	3%
ND-8671	1555	UCAGCCUCAACAUCACCUUsT	1556	AGGUUGAuGUGAGGCUUGATsT	90%	17%	53%	13%
ND-8672	1557	CAGCCUCAACAUCACCUUsT	1558	GAGGUUGAuGUGAGGCUUGTsT	17%	3%	11%	3%
ND-8673	1559	GGAGCUGGACCGCAUCATsT	1560	UGUGAUGCGGUCCAGCUUsT	25%	3%	18%	3%
ND-8674	1561	GUACCGCUUCACUACAUCTsT	1562	GAUGUAGUGGAAGCGGUACTsT	21%	4%	16%	4%
ND-8675	1563	CCGCUUCACUACAUCAACTsT	1564	GUUGAUGUAGUGGAAGCGTsT	25%	4%	19%	3%
ND-8676	1565	CGCUUCACUACAUCAACTsT	1566	UGUUGAuGUGGAAGCGTsT	16%	3%	14%	1%
ND-8677	1567	UUCACUACAUCAUCAUCTsT	1568	GGAuGUUGAuGUGGAAGTsT	110%	19%	97%	9%

ND-8678	1569	UGGGCAACUUCACUUCGCTsT	1570	GCGAAGAUGAAGUUGCCATsT	50%	8%	40%	5%
ND-8679	1571	GCAACUUCACUUCGCGCTsT	1572	CAGGCGAAGAUAGAGUUGCTsT	19%	3%	17%	2%
ND-8680	1573	CAACUUCACUUCGCGCTsT	1574	GCAGGCGAAGAUAGAGUUGCTsT	25%	2%	23%	2%
ND-8681	1575	AACUUCACUUCGCGCTsT	1576	GCAGGCGAAGAUAGAGUUGCTsT	104%	7%	65%	10%
ND-8682	1577	ACUUCACUUCGCGCTsT	1578	CGGCGGCGAAGAUAGAGUUGCTsT	91%	8%	63%	9%
ND-8683	1579	CUUCACUUCGCGCTsT	1580	GCGGCGGCGAAGAUAGAGUUGCTsT	88%	6%	58%	6%
ND-8684	1581	UCAUCUUCGCGCTsT	1582	AAGCGGCGGCGAAGAUAGATsT	76%	3%	64%	4%
ND-8685	1583	CAUCUUCGCGCTsT	1584	GAAGCGGCGGCGAAGAUAGATsT	15%	1%	18%	3%
ND-8686	1585	UCUUCGCGCTsT	1586	UUGAAGCGGCGGCGAAGATsT	109%	22%	31%	3%
ND-8687	1587	CGCUCGCGCTsT	1588	CUGGUUGAAGCGGCGGCTsT	90%	21%	49%	2%
ND-8688	1589	GCCUCGCGCTsT	1590	CCUGGUUGAAGCGGCGGCTsT	43%	9%	24%	7%
ND-8689	1591	AUUAUCUCACUUCACCCTsT	1592	UGGUGGAAGUGAGAGUAATsT	27%	4%	19%	2%
ND-8690	1593	UUACUUCACUUCACCCTsT	1594	GUGGUGGAAGUGAGAGUAATsT	109%	7%	85%	8%
ND-8691	1595	ACUCUUCACUUCACCCTsT	1596	GGGUGGUGGAAGUGAGAGUTsT	93%	11%	87%	12%
ND-8692	1597	UCUGCACCCUCAUCCUATsT	1598	UAGGGAUUGAGGGUGCAGATsT	31%	12%	17%	2%
ND-8693	1599	CUGCACCCUCAUCCUACTsT	1600	GUAGGGAUUGAGGGUGCAGTsT	41%	25%	31%	4%
ND-8694	1601	UGCACCCUCAUCCUACATsT	1602	UGUAGGGAUUGAGGGUGCATsT	75%	25%	43%	3%
ND-8695	1603	ACCCUCAUCCUACAGGUTsT	1604	ACCUUGUAGGGAUUGAGGGUTsT	65%	26%	25%	5%
ND-8696	1605	CCCUCAUCCUACAGGUATsT	1606	UACCUUGUAGGGAUUGAGGGTsT	18%	2%	13%	1%
ND-8697	1607	CCUCAUCCUACAGGUACTsT	1608	GUACCUUGUAGGGAUUGAGGTsT	16%	4%	13%	2%
ND-8698	1609	AACCGAACAACUCCGACUTsT	1610	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUTsT	40%	2%	30%	2%
ND-8699	1611	AACAAUCCGACUGCUUCUTsT	1612	AGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	56%	4%	45%	3%
ND-8700	1613	ACAAUCCGACUGCUUCUATsT	1614	UAGAAGCAGUCCGAUUUGUTsT	18%	3%	12%	1%
ND-8701	1615	CAAAUCCGACUGCUUCUACTsT	1616	GUAGAAGCAGUCCGAUUUGTsT	15%	2%	15%	4%
ND-8702	1617	GCACCCUCAUCCUACACTsT	1618	CUUGAGGGAUUGAGGGUGCTsT	53%	4%	46%	20%
ND-8703	1619	CCUCAACAACCUCAACTsT	1620	GUUGAGGUUGAUGUUGAGGTsT	25%	6%	26%	9%
ND-8704	1621	CUACAACAACCUCAACUTsT	1622	AGUUGAGGUUGAUGUUGAGTsT	30%	8%	37%	26%
ND-8705	1623	UCAACAACAACCUCAUCTsT	1624	GAGUUGAGGUUGAUGUUGATsT	55%	1%	50%	10%
ND-8706	1625	UACCGCUUCACUACAUCATsT	1626	UGAUGUAGUGGAAGCGGUATsT	36%	7%	31%	7%
ND-8707	1627	ACCGCUUCACUACAUCATsT	1628	UUGAUGUAGUGGAAGCGGUTsT	23%	5%	27%	10%
ND-8708	1629	GCUUCACUACAUCACAUTsT	1630	AUGUUGAUGUAGUGGAAGCTsT	16%	4%	24%	12%
ND-8709	1631	CUUCCACUACAACAUCTsT	1632	GAUGUUGAUGUAGUGGAAGTsT	62%	3%	74%	27%
ND-8710	1633	UCCACUACAACAUCUCTsT	1634	AGGAUGUUGAUGUAGUGGATsT	45%	8%	41%	1%
ND-8711	1635	CCACUACAACAUCUUGTsT	1636	CAGGAUGUUGAUGUAGUGGTsT	23%	4%	27%	10%
ND-8712	1637	CUGGCAACUUCUUCGCTsT	1638	CGAAGAUAGAGUUGCCAGTsT	34%	4%	26%	5%
ND-8713	1639	GGCAACUUCUUCGCGCTsT	1640	AGCGCAAGAUAGAGUUGCCTsT	30%	3%	23%	2%
ND-8714	1641	UUCAUCUUCGCGCTsT	1642	AGCGCGAGGCGAAGAUAGATsT	90%	14%	85%	14%
ND-8715	1643	UCGCGCGCUUCAACCATsT	1644	UGGUUGAAGCGGCGGCTsT	23%	2%	20%	4%

Tabla 2A: Concentración al 50% de inhibición (CI50) para agentes de ARNi a modo de ejemplo de la tabla 1A

ID de dúplex	CI50 [nM]	
	1º DRC en	2º DRC en
	H441	H441
ND8294	0,1949	0,0468
ND8295	0,1011	0,0458
ND8299	0,5986	0,5638
ND8302	0,0144	0,0134
ND8313	0,0315	0,0124
ND8320	0,0796	0,0078
ND8331	0,0213	0,0158

(continuación)

ND8332	0,0205	0,0089
ND8343	0,0523	0,0293
ND8348	0,0156	0,0182
ND8356	0,0241	0,0099
ND8357	0,0054	0,0032
ND8363	0,1186	0,0337
ND8368	0,0487	0,1209
ND8371	0,0811	0,0911
ND8372	0,0584	0,0425
ND8373	0,0066	0,0165
ND8375	0,1176	0,1187
ND8380	0,6817	0,5747
ND8381	0,0037	0,0041
ND8383	0,0275	0,1257
ND8384	0,0357	0,0082
ND8391	0,0260	0,0349
ND8392	0,3831	0,4775
ND8396	0,0023	0,0052
ND8403	0,0808	0,0759

Tabla 2B: Concentración al 50% de inhibición (CI50) y para agentes de ARNi a modo de ejemplo de la tabla 1D

ID de dúplex	CI50 [nM]	CI50 [nM]
	1º DRC en	2º DRC en
	H441	H441
ND8441	0,6738	0,8080
ND8443	0,0346	0,0263
ND8449	0,0120	0,0067
ND8450	0,0257	0,0106

(continuación)

ND8451	0,1320	0,0931
ND8453	0,0079	0,0033
ND8489	0,1640	0,1593
ND8496	0,0387	0,0185

Tabla 2C: % de actividad de la iARN a modo de ejemplo hacia la inhibición de la expresión génica de alfa-ENaC en los ensayos descritos en el ejemplo 3

Identificador de dúplex	% de expresión de alfa-ENaC en HBEC primarias (% del control)	
	ARNic 50 nm	ARNic 45 nm
No transfectado	77,2	n/a
Control que no selecciona como diana	100	93,3
Control negativo (alfa-ENaC no de macaco)ND8449	n/a	100
ND-8302	30,2	57
ND-8332	24,7	54,3
ND-8348	40,1	56,2
ND-8356	36,6	55,8
ND-8357	29,6	50,4
ND-8373	30,4	53,8
ND-8381	32,5	40,4
ND-8396	34,1	46,3
ND-8450	45,9	78,9
ND-8453	30,1	55,3

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un agente de ARNi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en la que:
- 5 a. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND8396 (SEQ ID NO: 223) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de ND8396 (SEQ ID NO: 224); o
- b. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND8612 (SEQ ID NO: 527) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de ND8612 (SEQ ID NO: 528); o
- 10 c. la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de ND10781 (SEQ ID NO: 1281) y la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 ó 3 nucleótidos de la hebra antisentido de ND10781 (SEQ ID NO: 1282).
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la hebra antisentido tiene 30 nucleótidos o menos de longitud, y en la que la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región de dúplex de 15 a 30 pares de nucleótidos de longitud.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que la hebra antisentido y la hebra sentido tienen cada una de 19 a 23 nucleótidos de longitud.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende una modificación que hace que el agente de ARNi tenga una estabilidad aumentada en una muestra biológica.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende un fosforotioato o un nucleótido modificado en 2'.
6. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende:
- 25 al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en el que la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'.
- 30 7. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende una modificación en 2' seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).
8. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende un extremo romo.
9. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende una proyección de nucleótidos que tiene de 1 a 4 nucleótidos desapareados.
- 35 10. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi comprende una proyección de nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido del agente de ARNi.
11. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi es ND8396 (SEQ ID NO: 223 y 224).
12. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi es ND8612 (SEQ ID NO: 527 y 528).
13. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi es ND10781 (SEQ ID NO: 1281 y 1282).
- 40 14. Composición según la reivindicación 1, en la que el agente de ARNi se liga a uno o más de compuesto de diagnóstico, grupo indicador, agente de reticulación, resto que confiere resistencia a nucleasas, base nitrogenada natural o poco común, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecogenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado con epifriedelanol, vitamina, hidrato de carbono, dextrano, pululano, quitina, quitosano, hidrato de carbono sintético, pentadecámero de oligo-lactato, polímero natural, polímero de peso molecular bajo o medio, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de unión a proteína, molécula de selección como diana de integrina, molécula policatiónica, péptido, poliamina,
- 45

peptidomimético y/o transferrina.

15. Composición que comprende un agente de ARNi para alfa-ENaC, en la que el agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido,

5 en la que la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra sentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste en ND8396 (SEQ ID NO: 223), ND8612 (SEQ ID NO: 527) y ND10781 (SEQ ID NO: 1281) y

en la que la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste en ND8396 (SEQ ID NO: 224), ND8612 (SEQ ID NO: 528) y ND10781 (SEQ ID NO: 1282),

10 comprendiendo además la composición un ligando de receptor epitelial.

16. Composición según la reivindicación 15, en la que el ligando de receptor epitelial es (i) transferrina o (ii) ácido fólico.

17. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 15, para su uso en terapia.

15 18. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por disfunción del canal de sodio epitelial seleccionada del grupo de: fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, infecciones de las vías respiratorias, carcinoma de pulmón, síndrome de Liddle, hipertensión, insuficiencia renal y desequilibrio hidroelectrolítico.

Figura 1:

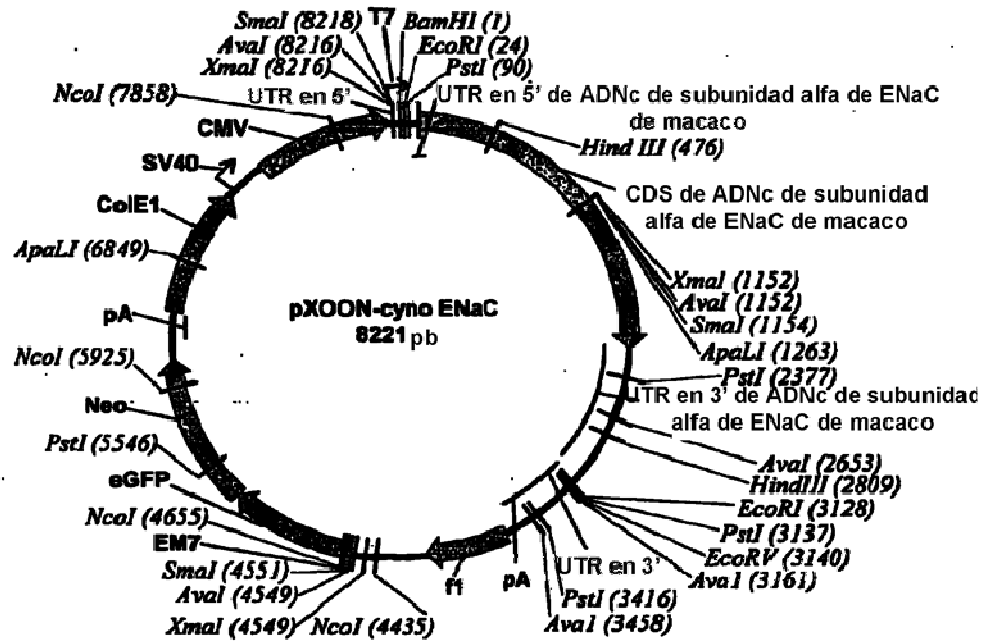


Figura 2..

SEQ.I.D.NO:1682

GAATTCGCCCTTGGCCGCTGCACCTGTAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGA
 CCCTAGACCTCTGCAGCCCACCGCAGGGCTCATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCA
 GGACGCTAGCCCTCCACAGCCCACCCAGGGCTCATGAAGGGGGACAAGCGTGAGGA
 GCAGGGGCTGGGCCCAGAACCTGCGGCACCCAGCAGCCCACGGCGGAGGAGGAGGC
 CCTGATCGAGTTCCACCGCTCTAECGAGAGCTCTTCGAGTTCCTGCAACAATAC
 CACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCCAGCACAACCGCATGAAGACGGC
 CTTCTGGGCAGTGTCTGGCTCTGEACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTCGGCCT
 GCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCGGA
 CAAGCTTGTCTTCCCCGAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTATCCGGA
 AATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACACAGCAGACGCTCTTTGACCT
 GTACAAATACGACTCCTCCCCACCCCTCGTGGCCGGCTCCC CGGCCGTCGTGACCT
 GCGGGGCACTCTGCCGCACCTCTTGCAGCGCCTGAGGGTCCCGTCCCGCTTCACGG
 GGCCCGTCAAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCGTGCGGGACAACAACCCCAAGTGGA
 CTGGAAGGACTGGAAGATCGGTTTCGAGCTGTGCAACCAGAACAAATCAGACTGCTT
 CTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCAGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTA
 CATCAACATCCTGTCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACACT
 GGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTA
 CTCTCACTTCCACCACCCAATGTATGGAAGTCTATACTTTCAATGACAAGAACAA
 CTCTAACCCTCGATGTCTTCCATGCCCTGGAGTCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCT
 GCGCACAGAGCAGAATGACTTCAATCCCTGCTGTCCACAGTGAAGTGGGGCCCGGT
 AATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCG
 GCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAGCCCTGGACAGACTTGGGGG
 CGACTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGTATCCCTGTCAAGAACCTTTACCC
 TTCAAAGTACACGCAGCAGGTGTGTATCACTCCTGCTTCCAGGAGAACATGATCAA
 GGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCGAGAACATGGAGTACTGTGA
 CTACAGGAAGCACAGTTCTGGGGCTACTGCTACTATAAGCTCCAGGCTGACTTCTC
 CTCAGACCACCTGGGCTGTTTCAACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGTGTGACCAGCTA
 CCAGCTCTCGGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTT
 CGAGATGCTATCGCGACAGAACAACCTACACCATCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGC
 CAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTTCTGAGTCTCCCTC
 TGTCACGATGGTCAACCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCCG
 CTCCTCAGTGTCTGTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCATCTTTGACCTGCTGGTCAT
 CACATTCCTCCTGCTGCTCCGAAGGTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGG
 GGACAGGGGTGCTCAGGAGGTGGCCCTCACCCAGGCATCTCCCCGCTTCCCACTT

CTGCCCCACCCACATCTCTGTACTTGTCCCAACTAGGGCCTGCTCCCTCCCCAGC
CTTGACAGCCCCCTCCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCTGCCATCTCCAGGGG
CTCCGCAGGGGCCAGCTCCACTGCCTATCCTCTGGGGGGCCCTGAGAGAGGAGAG
TTCTTGCACCAAGGCAGATGCTCCCCCTGGTGGGAGGGTGCTGCCCTTGGCAAGATT
GAAGGATGTGCAGGGCTTCTCTCAGAGCCGCCAAACTGCCCTTGATGTGTGGAGG
GGAAGCGAGATGGGTAAGGGGCTCAGGAAGTTGTTCCAAGAACAGTGGCCAATGAAG
CTGCCCAGAAGTGCTTGGCTCTGGCTCTGTACCCCTTGGTACTGCCTCTGAACACT
CTGGTTTCCCCACCCAACTGCAGCTAAGTCTCCTTTTCCCTTGGATCAGCCAAGCCA
AACTTGGAGCTTTGACAAGGAACCTTCTAAGAAATGGCTGATGACCAGGACAAAAC
ACAACCAAGGTACACACAGGCATGCACGCGTTTCTGCCTGGCGACAGGTGAAGCC
AGCCCCGACTGACCTGGCCACACTGCTCTCCAGTAACACAGATGCTGCCCCCTCAT
CTTGAACCTGGGTGGGAAACCCACCCAAAAGCCCCCTTATTACTTAGGCAATTCC
CCTTCCCTGACTCCCGAGAGCCAGGGCCAGAGCAGACCCGTATAAGTAAAGGCAGCT
CCAGGGCTCCTCTAGGCTCATACCCGTGCCCTCACAGAGCCATGCTCCAGCGCTTCT
GTCTGTGTCTTTCGTCCCTCTACATGCTGCTCAAGACATTTTCTCAGCCTGAAAG
CTTCCCAGCCATCTGCCGGAGAATCCTATGCATCCCTCAGAACCCTGCTCAGACA
CCATTACTTTTGTGAAGGCTTCTGCCACATCTGTGTCGCCAAAAATTGATCACTCC
CCTTTCGTGGTGGCTCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTGTGCTGTGCA
CCATACTTCTTGTACGTTTGTGTCTGCCCTCCCAACTGGACTGTGAGGGCCTTGTG
GCCAGGGACTGAGTCTTGGCCGTTTATGTATGCTCCGTGTCTAGCCCATCATCTGC
TTGAAGCAAGTAGGCAGATGCTCAAAGGGCGAATTCTGCAGATATC

Traducción:

SEQ. I .D. NO : 1681

MEGNKLEEQDASPPQPTPGLMKGDKREEQGLGPEPAAPQOPTAE E E E A L I E F H
RSYRELF E F F C N N T I H G A I R L V C S Q H N R M K T A F W A V L W L C T F G M M Y W Q F G L L F G E Y
F S Y P V S L N I N L N S D K L V F P A V T I C T L N P Y R Y P E I K E E L E E L D R I T Q Q T L F D L Y K Y D S
S P T L V A G S R G R R D L R G T L P H L L Q R L R V P S P L H G A R Q A R S V A S S V R D N N P Q V D W K D W K
I G F E L C N Q N K S D C F Y Q T Y S S G V D A V R E W Y R F H Y I N I L S R L P E T L P S L E E D T L G N F I F
A C R F N Q V S C N Q A N Y S H F H H P M Y G N C Y T F N D K N S N L W M S S M P G V N N G L S L M L R T E Q N
D F I P L L S T V T G A R V M V H G Q D E P A F M D D G G F N L R P G V E T S I S M R K E A L D R L G G D Y G D C
T K N G S D V P V K N L Y P S K Y T Q Q V C I H S C F Q E N M I K E C G C A Y I F Y P R P Q N M E Y C D Y R K H S
S W G Y C Y Y K L Q A D F S S D H L G C F T K C R K P C S V T S Y Q L S A G Y S R W P S V T S Q E W V F E M L S R
Q N N Y T I N N K R N G V A K V N I F F K E L N Y K T N S E S P S V T M V T L L S N L G S Q W S L W F G S S V L S
V V E M A E L I F D L L V I T F L L L L R R F R S R Y W S P G R G D R G A Q E V A S T Q A S S P P S H F C P H P T
S L Y L S Q L G P A P S P A L T A P P P A Y A T L G P C P S P G G S A G A S S T A Y P L G G P

Figura 3

