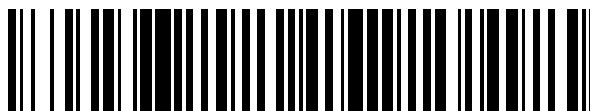


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 158**

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 10163501 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2223694**

54 Título: **Inhibición por ARNi 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 2 432 158 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 por ARNi de la expresión de alfa-ENaC

Campo técnico

- 5 La invención se relaciona con el campo de transporte de iones de las vías respiratorias mediadas por ENaC y las composiciones y métodos para modular la expresión de alfa-ENaC, y más particularmente con la inhibición de la expresión de alfa-ENaC mediante oligonucleótidos vía interferencia de ARN que se administran localmente a los pulmones y senos nasales a través de una administración intranasal/inhalación, o se administran sistémicamente, por ejemplo por medio de inyección intravenosa.

Antecedentes

- 10 La interferencia de ARN o "ARNi" es un término inicialmente acuñado por Fire and co-workers para describir la observación que ARN de doble cadena (ARNdc) puede bloquear la expresión del gen cuando se introduce en gusanos (Fire et al., Nature 391:806-811, 1998). El ARNdc corto dirige el silenciamiento post-transcripcional, específico del gen en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función del gen. Recientemente, numerosas veces se ha revisado esta tecnología, ver, por ejemplo
15 Novina, C.D.; and Sharp, P., Nature 2004, 430:161, y Sandy, P., et al., Biotechniques 2005, 39:215 .

- Las superficies mucosas en la interfase entre el medio ambiente y el cuerpo han desarrollado un número de mecanismos protectores. Una forma principal de dicha defensa innata es limpiar estas superficies con líquido. Por lo general, la cantidad de la capa líquida sobre una superficie mucosa refleja el balance entre la secreción del líquido epitelial, que a menudo refleja la secreción del anión (Cl^- y/o HCO_3^-) acoplado con agua (y un contraión catión), y absorción líquida epitelial, que a menudo refleja la absorción de Na^+ , acoplado con agua y contra anión (Cl^- y/o HCO_3^-). Muchas enfermedades de superficies mucosas se causan por muy poco líquido protector sobre aquellas superficies mucosas creadas por un desequilibrio entre la secreción (muy poco) y absorción (relativamente mucho). Los procesos defectuosos de transporte de la sal que caracterizan estas disfunciones mucosas residen en la capa epitelial de la superficie mucosa. Un enfoque para reponer la capa líquida protectora en las superficies mucosas es "re-balancear" el sistema mediante el bloqueo del canal de Na^+ mediando en la absorción del líquido. La proteína epitelial que media la etapa limitante de la velocidad de absorción del líquido y Na^+ es el canal de Na^+ epitelial (ENaC). El alfa-ENaC se posiciona en la superficie apical del epitelio, i.e. la interfase ambiente-superficie mucosa. La inhibición del alfa-ENaC mediada por el Na^+ atenúa la absorción del líquido puede alcanzar utilidad terapéutica. Por lo tanto, existe una necesidad del desarrollo de terapias efectivas para el tratamiento y prevención de enfermedades o trastornos en los cuales se involucra el alfa-ENaC, por ejemplo fibrosis quística en humanos y animales, y particularmente para terapias con alta eficiencia. Un requisito previo de alta eficiencia es que el ingrediente activo no se degrade muy rápido en un ambiente fisiológico.
- 20
25
30

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

35 Resumen

En un primer aspecto la presente invención provee una composición que comprende un agente ARNi que comprende una cadena codificante y una cadena no codificante, en donde:

- 40 a. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8357 (SEQ ID NO: 145), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8357 (SEQ ID NO: 146); o
- b. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8573 (SEQ ID NO: 449), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8573 (SEQ ID NO: 450); o
- 45 c. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8313 (SEQ ID NO: 57), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8313 (SEQ ID NO: 58).

En un segundo aspecto, la presente invención provee una composición que comprende un agente ARNi para alfa-ENaC, en donde el agente ARNi comprende una cadena codificante y una cadena no codificante,

en donde la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de un agente ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8357 (SEQ ID NO: 145), ND8573 (SEQ ID NO: 449) y ND8313 (SEQ ID NO: 57) y en donde la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de un agente ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8357 (SEQ ID NO: 146), ND8573 (SEQ ID NO: 450) y ND8313 (SEQ ID NO: 58), la composición que además comprende un ligando de receptor epitelial.

En un tercer aspecto, la presente invención provee una composición que comprende un agente ARNi, como se describe anteriormente en este documento, para uso en terapia.

Las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones del agente ARNi se pueden utilizar con cualquier dosificación y/o formulación descrita en este documento, así como con cualquier ruta de administración descrita en este documento.

Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la descripción a continuación. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de esta descripción, los dibujos, y de las reivindicaciones.

En las figuras:

Figura 1: Mapa de la restricción digerida de la construcción pXoon para α -EnaC de cinomólogo clonado.

Figura 2: Secuencia de ADN y proteína de alfa-EnaC de mono cinomólogo.

Figura 3: Clonación de los sitios de reconocimiento inespecíficos y específicos pronosticados en la construcción indicadora de luciferasa doble AY535007. Los fragmentos consisten de 19nt del sitio diana pronosticado y 10 nt de secuencia flanqueante en ambos extremos 5' y 3'.

Descripción detallada

Para facilitar la exposición el término "nucleótido" o "ribonucleótido" algunas veces se utiliza en este documento en referencia a una o más subunidades monoméricas de un agente ARN. Será entendido que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido" en este documento, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, también puede referirse a un nucleótido modificado, o fracción de reemplazo sustituto, como se describe además a continuación, en una o más posiciones.

Un "agente ARN" como se utiliza en este documento, es un ARN no modificado, ARN modificado, o sustituto de nucleósido, cada uno de los cuales se describe en este documento o es bien conocido en la técnica de ARN sintético. Mientras numerosos ARNs modificados y sustitutos de nucleósidos se describen, ejemplos preferidos incluyen aquellos que tienen mayor resistencia a la degradación por la nucleasa que los ARNs no modificados. Ejemplos preferidos incluyen aquellos que tienen una modificación de azúcar en 2', una modificación en un saliente de cadena sencilla, preferiblemente un saliente de cadena sencilla 3', o, particularmente si la cadena sencilla, una modificación en 5' que incluye una o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

Un "agente ARNi" (abreviatura para "agente ARN interferente") como se utiliza en este documento, es un agente ARN, que puede inhibir la expresión de un gen diana, *por ejemplo* el gen ENaC SCNN1A. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, un agente ARNi puede actuar mediante uno o más de un número de mecanismos, incluyendo corte post-transcripcional de un ARNm diana algunas veces denominado en la técnica como ARNi, o mecanismos pre-transcripcional o de pre-traducción.

Un "agente ARNi dc" (abreviatura para "agente ARNi de doble cadena"), como se utiliza en este documento, es un agente ARNi que incluye más de una, y preferiblemente dos, cadenas en las cuales la hibridación intercadena puede formar una región de estructura doble. Una "cadena" en este documento se refiere a una secuencia de nucleótidos contiguos (incluyendo nucleótidos de origen no-natural o modificados). Las dos o más cadenas pueden ser, o cada una formar una parte de, moléculas separadas, o pueden estar interconectadas covalentemente, *por ejemplo*, por un ligador, *por ejemplo*, un ligador polietilenglicol, para formar una molécula. Al menos una cadena puede incluir una región que es suficientemente complementaria a un ARN diana. Tal cadena se denomina la "cadena no codificante". Una segunda cadena del agente ARNdc, que comprende una región complementaria a la cadena no codificante, se denomina la "cadena codificante". Sin embargo, un agente ARNi dc, también se puede formar a partir de una molécula de ARN sencilla que es al menos parcialmente auto-complementaria, formando, *por ejemplo*, una estructura de horquilla o panhandle, incluyendo una región dúplex. Estos últimos, en este documento denominados como ARN(s) de tipo horquilla corta o ARNsh(s). En tal caso, el término "cadena" se refiere a una de las regiones de la molécula de ARN es decir complementaria a otra región de la misma molécula de ARN.

Aunque, en las células de mamífero, los agentes ARNi dc largos pueden inducir la respuesta del interferón que es con frecuencia perjudicial, los agentes ARNi dc cortos no activan la respuesta del interferón, al menos no en un grado que sea perjudicial a 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 ARNi incluyen moléculas que son suficientemente cortos que no activan una respuesta de interferón no-específica perjudicial en células de mamífero normales. Por lo tanto, la administración de una composición incluyendo un agente ARNi (*por ejemplo*, formulada como se describe en este documento) a un sujeto puede ser utilizada para disminuir la expresión de alfa-ENaC en el sujeto, mientras se elude una respuesta de interferón. Las moléculas que son suficientemente cortas que no activan una respuesta de interferón perjudiciales se denominan agentes ARNsi o ARNsi(s) en este documento. "Agente ARNsi" o "ARNsi" como se utiliza en este documento, se refiere a un agente ARNi, *por ejemplo*, un agente ARNi dc, que es suficientemente corto que no induce una respuesta de interferón perjudicial en un mamífero, y particularmente un humano, célula, *por ejemplo*, tiene una región dúplex de menos de 60 pero, preferiblemente menos de 50, 40, o 30 pares de nucleótidos.

Los agentes ARNi aislados descritos en este documento, incluyendo agentes ARNi dc y agentes ARNsi, pueden mediar la disminución de la expresión de alfa-ENaC, *por ejemplo*, mediante la degradación de ARN. Por conveniencia, dicho ARN también se denomina en este documento como el ARN que se silencia. Dicho ácido nucleico también se denomina como un "ARN diana", algunas veces "molécula de ARN diana" o algunas veces "gen diana".

Como se utiliza en este documento, la frase "ARNi media" se refiere a la capacidad de un agente para silenciar, de una manera específica la secuencia, un gen diana. "Silenciamiento de un gen diana" significa el proceso por el cual una célula que contiene y/o que expresa un cierto producto del gen diana cuando no entra en contacto con el agente, contendrá y/o expresará al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% menos de dicho producto génico cuando se pone en contacto con el agente, en comparación con una célula similar que se ha puesto en contacto con el agente. Dicho producto del gen diana, *por ejemplo*, puede ser un ARN mensajero (ARNm), una proteína, o un elemento regulador.

Como se utiliza en este documento, el término "complementario" se utiliza para indicar un grado suficiente de complementariedad tal que el enlace estable y específico ocurre entre un compuesto de la invención y una molécula de ARN diana, *por ejemplo*, ARNm de alfa-ENaC. El enlace específico requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar un enlace no-específico del compuesto oligomérico con las secuencias no-diana bajo condiciones en las cuales se desea un enlace específico, *i.e.*, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, bajo condiciones en las cuales los ensayos se llevan a cabo. Por lo general, las secuencias no-dianas difieren de las secuencias diana por al menos 2, 3 o 4 nucleótidos.

Como se utiliza en este documento, un agente ARNi es "suficientemente complementario" a un ARN diana, *por ejemplo*, un ARNm diana (*por ejemplo*, ARNm de alfa-ENaC) si el agente ARNi reduce la producción de una proteína codificada por el ARN diana en una célula. El agente ARNi también puede ser "exactamente complementario" al ARN diana, *por ejemplo*, el ARN diana y el agente ARNi hibridado, preferiblemente para formar un híbrido fabricado exclusivamente de pares de base de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un agente 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 modalidades, el agente ARNi específicamente discrimina una diferencia de nucleótido único. En este caso, el agente ARNi solo media ARNi si la complementariedad exacta se encuentra en la región (*por ejemplo*, entre 7 nucleótidos de) la diferencia de nucleótido único. Los agentes ARNi preferidos se basaran o consistirán o comprenderán las secuencias sentido y antisentido proporcionadas en las Tablas 1A-1D.

Como se utiliza en este documento, "idéntico esencialmente" cuando se utiliza en referencia a una primera secuencia de nucleótido en comparación con una segunda secuencia de nucleótido significa que la primera secuencia de nucleótido es idéntica a la segunda secuencia de nucleótido excepto por hasta una, dos o tres sustituciones de nucleótido (*por ejemplo*, adenosina reemplazada por uracilo). "Esencialmente que retiene la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas", como se utiliza en este documento en referencia a un agente ARNi no idéntico pero derivado de uno de los agentes ARNi de las Tablas 1A-1D, mediante la deleción, la adición o sustitución de nucleótidos, significa que el agente derivado de ARNi posee una actividad inhibitoria no menor de 20% de la actividad inhibitoria del agente ARNi de las Tablas 1A-1D de las cuales fue derivado. *Por ejemplo*, un agente ARNi derivado de un agente ARNi de las Tablas 1A-1D que baja la cantidad de ARNm de alfa-ENaC presente en un 70% en las células humanas cultivadas por si mismo puede reducir la cantidad de ARNm presente en las células humanas cultivadas en al menos 50% con el fin de ser considerados como que esencialmente retiene la capacidad para inhibir la replicación de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Opcionalmente, un agente ARNi puede bajar la cantidad de ARNm de alfa-ENaC presente en las células humanas cultivadas en al menos 50%.

Como se utiliza en este documento, un "sujeto" se refiere a un organismo mamífero sometido a tratamiento para un trastorno mediado por alfa-ENaC. El sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como la vaca, caballo, ratón, rata, perro, cerdo, cabra, o un primate. En la modalidad preferida, el sujeto es un humano.

Diseño y Selección de agentes ARNi

5 Como se utiliza en este documento, "trastornos asociados con la expresión de alfa-ENaC" se refiere a cualquier estado biológico o patológico que (1) se media al menos en parte por la presencia de alfa-ENaC y (2) cuyo resultado se puede afectar reduciendo el nivel del alfa-ENaC presente. Los trastornos específicos asociados con la expresión de alfa-ENaC se registran a continuación.

10 La presente divulgación se basa en el diseño, síntesis y generación de agentes ARNi que dirigen alfa- ENaC y la demostración del silenciamiento génico de alfa-ENaC *in vitro* en células cultivadas después de la incubación con un agente ARNi, y el efecto protector resultante dirigido hacia los trastornos mediados por alfa-ENaC.

15 Un agente ARNi se puede diseñar racionalmente basándose en la información de la secuencia y las características deseadas. Por ejemplo, un agente ARNi se puede diseñar de acuerdo con la temperatura de fusión relativa del dúplex candidato. En general, el dúplex debe tener una temperatura de fusión inferior en el extremo 5' de la cadena no codificante, que en el extremo 3' de la cadena no codificante.

La presente divulgación provee las composiciones que contienen ARNsi(s) y/o ARNsh(s) dirigido a uno o más transcritos de alfa-ENaC.

20 Para cualquier diana del gen particular que se selecciona, el diseño de ARNsi(s) o ARNsh(s) para utilizar de acuerdo con la presente divulgación preferiblemente seguirá ciertas pautas. También, en muchos casos, el agente que se transmite a una célula de acuerdo con la presente divulgación puede experimentar una o más etapas del proceso antes de convertirse en un agente de supresión activo (ver a continuación para una mayor discusión); en tales casos, los expertos normales en la técnica apreciarán que el agente pertinente preferiblemente será diseñado para incluir secuencias que pueden ser necesarias para su proceso.

25 Las enfermedades mediadas por la disfunción del canal de sodio epitelial, incluyen las enfermedades asociadas con la regulación de volúmenes de líquidos a través de las membranas epiteliales. Por ejemplo, el volumen de líquido de superficie de las vías respiratorias es un regulador clave de aclaramiento mucociliar y el mantenimiento de salud pulmonar. El bloqueo del canal de sodio epitelial promoverá la acumulación de fluido en el lado de la mucosa del epitelio de las vías respiratorias promoviendo así la eliminación del moco y previniendo la acumulación de moco y esputo en tejidos respiratorios (incluyendo las vías respiratorias pulmonares). Tales enfermedades incluyen enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, disquinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, infecciones de las vías respiratorias (aguda y crónica; viral y bacteriana) y carcinoma de pulmón. Las enfermedades mediadas por el bloqueo del canal de sodio epitelial también incluyen enfermedades distintas de enfermedades respiratorias que se asocian con la regulación anormal de líquidos a través de un epitelio, quizás que relacionan la fisiología anormal de los líquidos de superficie protectora sobre su superficie, por ejemplo, xerostomía (boca seca) o queratoconjuntivitis sicca (ojo seco). Por otra parte, el bloqueo del canal de sodio epitelial en el riñón podría ser utilizado para promover la diuresis y con ello inducir un efecto hipotensor.

El tratamiento puede ser sintomático o profiláctico.

40 Asma incluye tanto asma intrínseca (no-alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma suave, asma moderada, asma severa, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma ocupacional y asma inducida después de una infección bacteriana. También se debe entender que el tratamiento de asma abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 o 5 años, que muestran síntomas de sibilancia y diagnosticado o diagnosticables como "niños con sibilancia", una categoría establecida de pacientes de importante preocupación médica y ahora identificada a menudo como asmáticos incipientes o de fase temprana. (Por conveniencia, esta condición asmática particular se denomina como "síndrome de niños sibilantes").

45 La eficacia profiláctica en el tratamiento de asma se pondrá de manifiesto por una reducción de la frecuencia o severidad del ataque sintomático, por ejemplo, de ataque broncoconstrictor o asmático agudo, por una mejora en la función pulmonar o por una mejor hiperreactividad de las vías respiratorias. Además se puede poner de manifiesto por una reducción de la necesidad de otra, terapia sintomática, i.e., una terapia para o destinada a restringir o abortar un ataque sintomático cuando se produce, por ejemplo, con anti-inflamatorios (por ejemplo, corticosteroides) o broncodilatadores. El beneficio profiláctico en el asma puede ser evidente, en particular, en sujetos propensos a "morning dipping". El "Morning dipping" es un síndrome asmático reconocido, común a un importante porcentaje de asmáticos y caracterizado por un ataque de asma, por ejemplo, entre las 4 y las 6 de la mañana, i.e., en un

momento normalmente distante de forma sustancial de cualquier terapia previamente administrada para asma sintomática.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluye bronquitis crónica o disnea asociada con la misma, enfisema, así como exacerbación de la hiperreactividad de las vías respiratorias como consecuencia a otra terapia con fármacos, en particular, otra terapia con fármacos inhalados. La divulgación también es aplicable al tratamiento de bronquitis de cualquier tipo o génesis incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda, araquídica, catarral, crupal, crónica o ftinoide.

Con base en los resultados mostrados en este documento, la presente divulgación provee los agentes 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 proveen los agentes ARNi ejemplares dirigidos a alfa-ENaC, basándose en las abreviaturas de la nomenclatura estándar dadas en la Tabla A.

Tabla 1A, Seq Id No.s 305-608, Tabla 1B y Tabla 1D, Seq Id No.s 1519-1644 enumeran los ARNsi(s) que no comprenden las modificaciones de nucleótido excepto por un enlace fosforotioato entre el terminal 3' y las penúltimas timidinas. La Seq Ids restante en las Tablas 1A-1D enumera los ARNsi(s) en donde todos los nucleótidos que comprenden bases pirimidínicas son nucleótidos 2'-O-metil- modificados en la cadena codificante, 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 nucleótidos 2'-O-metil- modificados en la cadena no codificante.

Basándose en estos resultados, la divulgación específicamente provee un agente ARNi que incluye una cadena codificante que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias de cadena codificante de los agentes proporcionados en las Tablas 1A-1D, y una cadena no codificante que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias antisentido de los agentes proporcionados en las Tablas 1A-1D.

Los agentes ARNi mostrados en las Tablas 1A-1D se componen de dos cadenas de 19 nucleótidos de longitud que son complementarios o idénticos a la secuencia diana, más un saliente 3'-TT. La presente divulgación provee agentes que comprenden al menos 15, o al menos 16, 17, o 18, o 19 nucleótidos contiguos de estas secuencias. Sin embargo, mientras estas longitudes potencialmente pueden ser óptimas, los agentes ARNi no están destinados a ser limitados a estas longitudes. El experto es bien consciente que, los agentes ARNi más cortos o más largos pueden ser efectivos de forma similar, ya que, dentro de ciertos rangos de longitud, la eficacia es más bien una función de la secuencia de nucleótido que de la longitud de la cadena. Por ejemplo, Yang, et al., PNAS 99:9942-9947 (2002), demostraron eficacias similares de los agentes ARNi de longitudes entre 21 y 30 pares de base. Otros han demostrado silenciamiento eficaz de genes, mediante los agentes ARNi hasta una longitud de aprox. 15 pares de base (Byrom, et al., "Inducing RNAi with siRNA Cocktails Generated by RNase III" Tech Notes 10(1), Ambion, Inc., Austin, TX).

Por lo tanto, es posible y se contempla seleccionar a partir de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A-1D una secuencia parcial de entre 15 a 19 nucleótidos para la generación de un agente ARNi derivado de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A-1D. Alternativamente, se puede añadir 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 manera que los nucleótidos adicionales son complementarios a la secuencia respectiva del gen diana, *por ejemplo*, alfa-ENaC. Por ejemplo, los primeros 15 nucleótidos de uno de los agentes se pueden combinar con los 8 nucleótidos encontrados en 5' para esta secuencia en ARNm de alfa-ENaC para obtener un agente con 23 nucleótidos en las cadenas codificante y no codificante. Todos los agentes ARNi derivados se incluyen en los agentes ARNi, siempre que esencialmente retengan la capacidad para inhibir la replicación de alfa ENaC en células humanas cultivadas.

La cadena no codificante de un agente ARNi debe ser igual a o al menos, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, o 50 nucleótidos de longitud. Debe ser igual a o menos de 60, 50, 40, o 30, nucleótidos de longitud. Los rangos preferidos son 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

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

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

Generalmente, los agentes ARNi incluyen una región de complementariedad suficiente con el ARNm de alfa-ENaC, y tienen un longitud suficiente en términos de nucleótidos, para que el agente ARNi, o un fragmento de este, puedan mediar la inhibición de la expresión del gen alfa-ENaC. No es necesario que exista complementariedad perfecta

entre el agente ARNi y el gen diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el agente ARNi, o un producto de escisión de este, dirijan el silenciamiento específico de la secuencia, *por ejemplo*, mediante la escisión de ARNi de un ARNm de alfa-ENaC.

5 Por lo tanto, los agentes ARNi incluyen agentes que comprenden una cadena codificante y cadena no codificante cada una que comprende una secuencia de al menos 16, 17 o 18 nucleótidos que es idéntica esencialmente, como se define a continuación, a una de las secuencias de las Tablas 1A-1D, excepto que no más de 1, 2 o 3 nucleótidos por cadena, respectivamente, hayan sido sustituidos por otros nucleótidos (*por ejemplo* adenosina reemplazada por el uracilo), mientras que esencialmente retiene la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Por lo tanto, estos agentes poseerán al menos 15 nucleótidos idénticos a una de las 10 secuencias de las Tablas 1A-1D, pero 1, 2 o 3 apareamientos erróneos de bases con respecto a cualquiera de las secuencias de alfa-ENaC diana o entre la cadena codificante y no codificante se introducen. Los apareamientos erróneos para la secuencia de ARN de alfa-ENaC diana, particularmente en la cadena no codificante, son más tolerados en las regiones terminales y si se presentan, preferiblemente están en una región o regiones terminales, *por ejemplo*, entre 6, 5, 4, o 3 nucleótidos de un terminal 5' y/o 3', más preferiblemente entre 6, 5, 4, o 3 nucleótidos del terminal 5' de la cadena codificante o el terminal 3' de la cadena no codificante. La cadena codificante solo 15 necesita ser suficientemente complementaria con la cadena no codificante para conservar el carácter de doble cadena global de la molécula.

Se prefiere que las cadenas codificante y no codificante se elijan de tal manera que el agente ARNi incluya una cadena sencilla o región no apareada en uno o ambos extremos de la molécula. Por lo tanto, un agente ARNi 20 contiene las cadenas codificante y no codificante, preferiblemente apareadas para contener un saliente, *por ejemplo*, uno o dos salientes 5' o 3' pero preferiblemente un saliente 3' de 2-3 nucleótidos. La mayoría de las modalidades tendrán un saliente 3'. Los agentes de ARNsi preferidos tendrán salientes monocatenarios, preferiblemente salientes 3', de 1 a 4, o preferiblemente 2 o 3 nucleótidos, de longitud, en uno o ambos extremos del agente ARNi. Los salientes pueden ser el resultado de una cadena que es más larga que la otra, o el resultado de dos cadenas de la 25 misma longitud que están escalonadas. Los nucleótidos no apareados formando el saliente pueden ser ribonucleótidos, o pueden ser desoxiribonucleótidos, preferiblemente timidina. Los extremos 5' preferiblemente son fosforilados, o pueden ser no fosforilados.

Las longitudes preferidas para la región dúplex están entre 15 y 30, más preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, y 23 30 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, en el rango del agente de ARNsi discutido anteriormente. Los agentes de ARNsi pueden parecerse en longitud y estructura a los productos elaborados natural Dicer de ARNdc(s) largo. Las modalidades en las cuales las dos cadenas del agente de ARNsi se ligan, *por ejemplo*, ligado covalentemente, también se incluyen. Las estructuras de horquilla, u otra de monocatenaria que proveen la región bicatenaria requerida, y preferiblemente un saliente 3' también están dentro de la divulgación.

Evaluación de Agentes de ARNi Candidatos

35 Como se señaló anteriormente, la presente divulgación provee un sistema de identificación de los ARNsi(s) que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Dado que, como se indicó anteriormente, los ARNsh(s) se procesan intracelularmente para producir ARNsi(s) que tienen porciones dúplex con la misma secuencia como la estructura tallo del ARNsh, el sistema es útil igualmente para la identificación de los ARNsh(s) que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Para fines de descripción esta sección se referirá a ARNsi(s), pero el sistema también abarca los 40 ARNsh(s) correspondientes. Específicamente, la presente divulgación demuestra la preparación exitosa de ARNsi(s) dirigida para inhibir la actividad de alfa-ENaC. Las técnicas y reactivos descritos en este documento se pueden aplicar fácilmente a un diseño potencial nuevo ARNsi(s), dirigido a otros genes o regiones del gen, y probados por su actividad en la inhibición de alfa-ENaC como se discute en este documento.

45 En diferentes modalidades los inhibidores de alfa-ENaC potenciales se pueden probar para determinar la supresión de la expresión de alfa-ENaC endógena introduciendo los ARNsi(s) candidatos en las células (por ejemplo, por la administración exógena o introduciendo un vector o construcción que dirige la síntesis endógena de ARNsi en la célula), o en animales de laboratorio por administración pulmonar o nasal. Alternativamente, los inhibidores potenciales de alfa-ENaC se pueden probar *in vitro* por co-transfección transitoria de los ARNsi(s) candidatos junto con un plásmido de expresión de alfa-ENaC. La capacidad de los ARNsi(s) candidatos para reducir los niveles de 50 transcripción diana y/o para inhibir o suprimir uno o más aspectos o características de actividad de alfa-ENaC como diferencia potencial epitelial o absorción de líquidos de la superficie de vías respiratorias se evaluó, a continuación.

Las células o animales de laboratorio, a los cuales se les ha administrado las composiciones de ARNsi de la invención (animales/células de ensayo) se pueden comparar con células comparables o similares o animales de laboratorio que no han recibido la composición de la invención (células/animales control, por ejemplo, 55 células/animales que han recibido ya sea no ARNsi o un ARNsi control tal como un ARNsi dirigido a un transcrito no-endógeno tal como proteína fluorescente verde (GFP)). El fenotipo de transporte de iones de los animales/células de ensayo se puede comparar con el fenotipo de células/animales control, siempre que el ARNsi de la invención comparta reactividad cruzada de la secuencia con la especie/tipo de célula de ensayo. La producción de la proteína

de alfa-ENaC y corriente cortocircuito (*in vitro* o *ex vivo*) se puede comparar en los animales/células de ensayo con respecto a las células/animales control. Otros indicios de actividad de alfa-ENaC, incluyendo diferencia potencial epitelial *ex vivo* o eliminación mucociliar *in vivo* o Imágenes por resonancia magnética (MRI) de cuerpo completo, se pueden comparar de manera similar. Generalmente, animales/células de ensayo y células/animales control serían de la misma especie y, para células, de tipo de célula similar o idéntico. Por ejemplo, células de la misma línea celular se podrían comparar. Cuando la célula de prueba es una célula primaria, por lo general la célula control también sería una célula primaria.

Por ejemplo, la capacidad de un ARNsi candidato para inhibir la actividad de alfa-ENaC convenientemente se puede determinar por (i) la administración del ARNsi candidato a las células (ii) la evaluación de los niveles de expresión de ARNm de alfa-ENaC con respecto a un gen control expresado endógenamente (iii) la comparación de la corriente sensible-amilorida en un modelo celular *in vitro* producido en la presencia del ARNsi con la cantidad producida en la ausencia del ARNsi. Este último ensayo se puede utilizar para probar los ARNsi(s) que dirigen cualquier transcrito diana que puede influenciar la actividad de alfa-ENaC indirectamente y no se limita a ARNsi(s) que dirigen los transcritos que codifican las subunidades del canal ENaC.

La capacidad de un ARNsi candidato para reducir el nivel del transcrito diana se puede evaluar mediante la medición de la cantidad del transcrito diana utilizando, por ejemplo, transferencia Northern, ensayos de protección de la nucleasa, sonda de hibridación, PCR-(RT) transcripción inversa, PCR-RT tiempo real, análisis por microarrays, etc. La capacidad de un ARNsi candidato para inhibir la producción de un polipéptido codificado por el transcrito diana (ya sea al nivel transcripcional o post-transcripcional) se puede medir utilizando una variedad de enfoques basados en anticuerpos incluyendo, pero no limitando a, Western blots, inmunoensayos, ELISA, citometría de flujo, microarrays de proteínas, etc. En general, se puede utilizar cualquier método de medición de la cantidad de ya sea el transcrito diana o un polipéptido codificado por el transcrito diana.

En general, ciertos inhibidores ARNi del 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 a un grado aún mayor con respecto al nivel que estaría presente en la ausencia del inhibidor (por ejemplo, en una célula control comparable que carece del inhibidor). En general, ciertos inhibidores preferidos ARNi de alfa-ENaC 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 por 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 aún mayor.

Ciertos inhibidores preferidos ARNi de alfa-ENaC 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 después de la administración del ARNsi y la infección de las células. Ciertos inhibidores preferidos de alfa-ENaC impiden (i.e., reducen a niveles no detectables) 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 después de la administración del ARNsi. De acuerdo con diferentes modalidades una reducción significativa en la actividad de alfa-ENaC es una reducción a menos de aproximadamente 90% del nivel que se produciría en la ausencia del ARNsi, una reducción a menos de aproximadamente 75% del nivel que se produciría en la ausencia del ARNsi, una reducción a menos de aproximadamente 50% del nivel que se produciría en la ausencia del ARNsi, una reducción a menos de aproximadamente 25% del nivel que se produciría en la ausencia del ARNsi, o una reducción a menos de aproximadamente 10% del nivel que se produciría en la ausencia del ARNsi. La reducción de la actividad de alfa-ENaC se puede medir utilizando cualquier método apropiado incluyendo, pero no limitando a, la medición de corriente cortocircuito de la sensibilidad de amilorida *in vitro*, diferencia del potencial epitelial *ex vivo* o *in vivo* eliminación mucociliar o MRI pulmonar/cuerpo completo.

Pruebas de estabilidad, modificación, y volver a repetir el ensayo de agentes ARNi

Un agente ARNi candidato puede ser evaluado con respecto a la estabilidad, *por ejemplo*, su susceptibilidad a la escisión por una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando el agente ARNi se introduce en el cuerpo de un sujeto. Los métodos se pueden emplear para identificar los sitios que son susceptibles a la modificación, particularmente la escisión, *por ejemplo*, la escisión por un componente encontrado en el cuerpo de un sujeto. Tales métodos pueden incluir el aislamiento y la identificación de la mayoría de los fragmentos abundantes formados por la degradación del agente ARNi candidato después de su incubación con medio biológico aislado *in vitro*, por ejemplo suero, plasma, esputo, líquido cerebroespinal, o homogeneizados de tejidos o células, o después de poner en contacto un sujeto con el agente ARNi candidato *in vivo*, identificando de este modo los sitios propensos a la escisión. Tales métodos están, por ejemplo, sin limitación, en International Patent Application Publication No. WO2005115481, presentada el 27 de Mayo, 2005.

5 Cuando se identifican los sitios susceptibles a la escisión, otro agente ARNi se puede diseñar y/o sintetizar en donde el potencial 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 ARNi además pueden ser reprobados para determinar la estabilidad, y este proceso puede ser repetido hasta que se encuentre un agente ARNi que muestre la estabilidad deseada.

Prueba *in Vivo*

10 Un agente ARNi identificado como capaz de inhibir la expresión del gen de alfa-ENaC se puede probar para la funcionalidad *in vivo* en un modelo de animal (*por ejemplo*, en un mamífero, tal como en ratón, rata, cobaya o primate). Por ejemplo, el agente ARNi puede ser administrado a un animal, y el agente ARNi se evalúa 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 ARNi se puede administrar directamente al tejido diana, tal como por inyección, o el agente ARNi se puede administrar al modelo de animal de la misma manera que se puede administrar a un humano. Preferiblemente, el agente ARNi se administra en las vías respiratorias del sujeto, tal como mediante administración intranasal, inhalada o intratraqueal.

20 El agente ARNi también se puede evaluar para su distribución intracelular. La evaluación puede incluir la determinación de si el agente ARNi se recoge en la célula. La evaluación también puede incluir la determinación de la estabilidad (*por ejemplo*, la vida media) del agente ARNi. La evaluación de un agente ARNi *in vivo* se puede facilitar por el uso de un agente ARNi conjugado con un marcador trazable (*por ejemplo*, un marcador fluorescente tal como fluoresceína; un marcador radioactivo, tal como ³⁵S, ³²P, ³³P, o ³H; partículas de oro; o partículas de antígeno para inmunohistoquímica).

25 El agente ARNi se puede evaluar con respecto a su capacidad para reducir la expresión de alfa-ENaC. Se pueden medir los niveles de expresión del gen alfa-ENaC *in vivo*, por ejemplo, por hibridación *in situ*, o por el aislamiento de ARN a partir del tejido antes y después de la exposición al agente ARNi. Si se necesita que el animal sea sacrificado con el fin de recoger el tejido, un animal control sin tratar servirá para la comparación. El ARN de alfa-ENaC se puede detectar por cualquier método conocido, incluyendo pero no limitando a RT-PCR, northern blot, ensayo de ADN ramificado, o ensayo de protección de ARNasa. Alternativa, o adicionalmente, la expresión del gen de alfa-ENaC se puede monitorear mediante la realización de análisis de transferencia western o inmunotinción en extractos de tejido tratados con el agente ARNi.

30 Los potenciales inhibidores de alfa-ENaC se pueden probar utilizando cualquier variedad de modelos de animales que se han desarrollado. Las composiciones que comprenden ARNsi(s) candidatos, construcciones o vectores capaces de dirigir la síntesis de tales ARNsi(s) entre una célula huésped, o células modificadas o manipuladas para contener los ARNsi(s) candidatos se pueden administrar a un animal. Se evalúa la capacidad de la composición para suprimir la expresión de alfa-ENaC y/o para modificar los fenotipos dependientes de ENaC y/o disminuir su severidad con respecto a los animales que no han recibido el potencial inhibidor de alfa-ENaC. Tales modelos incluyen, pero no se limitan a, modelos de murino, rata, conejillo de indias, ovejas y primates no-humanos para fenotipos dependientes de ENaC, todos los cuales son conocidos en la técnica y se utilizan para probar la eficacia del potencial terapéutico de alfa-ENaC.

40 Utilizando los sistemas inventados para la identificación de agentes de ARNsi terapéuticos candidatos, los agentes terapéuticos apropiados se seleccionan de los Identificadores Dúplex ND-8302, ND-8332, ND-8348, ND-8356, ND-8357, ND-8373, ND-8381, ND-8396, ND-8450 y ND-8453, más convenientemente se seleccionan de ND-8356, ND-8357 y ND-8396.

Química de ARNi

45 Se describen en este documento los agentes ARNi aislados, *por ejemplo*, agentes de ARNdc que median ARNi para inhibir la expresión del gen alfa-ENaC.

50 Los agentes de ARN abordados en este documento incluyen de otra manera ARN no modificado, así como ARN que ha sido modificado, *por ejemplo*, para mejorar la eficacia, y los polímeros de sustitutos de nucleósidos. El ARN no modificado se refiere a una molécula en los cuales los componentes del ácido nucleico, a saber, azúcares, bases, y fracciones fosfato, son los mismos o esencialmente los mismos como aquellos que ocurren naturalmente, preferiblemente como los que ocurren en el cuerpo humano. La técnica se ha referido a los ARNs raros o inusuales, pero que ocurren naturalmente como ARNs modificados, ver, *por ejemplo*, Limbach et al. Nucleic Acids Res. 22: 2183-2196, 1994. Tales ARNs raros o inusuales, a menudo denominados ARNs modificados (aparentemente debido a que son por lo general el resultado de una modificación post-transcripcional) están entre el término ARN no modificado, como se utiliza en este documento. ARN modificado como se utiliza en este documento se refiere a una

molécula en la cual uno o más de los componentes del ácido nucleico, a saber azúcares, bases, y fracciones fosfato, son diferentes de los de origen natural, preferiblemente diferentes de los que se producen en el cuerpo humano. Mientras que se denominan como "ARNs" modificados, debido a la modificación, por supuesto incluirán moléculas que no son ARNs. Los sustitutos de nucleósidos son moléculas en las cuales el esqueleto ribofosfato se reemplaza con una construcción no-ribofosfato que permite las bases a la presentada en la correcta relación espacial tal que hibridación es sustancialmente similar al que se ve con un esqueleto ribofosfato, *por ejemplo*, miméticos no-cargados del esqueleto ribofosfato. En este documento se discuten los Ejemplos de lo anterior.

Las modificaciones descritas en este documento se pueden incorporar en cualquier ARN de doble cadena y molécula similar a ARN descrita en este documento, *por ejemplo*, un agente ARNi. Puede ser deseable para modificar una o ambas de las cadenas codificantes y no codificantes de un agente ARNi. Como los ácidos nucleídos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas a continuación ocurren en una posición que se repite entre un ácido nucleico, *por ejemplo*, una modificación de una base, o una fracción de fosfato, o el oxígeno no-ligado de una fracción de fosfato. En algunos casos la modificación se producirá en todas las posiciones en cuestión en el ácido nucleico pero en muchos, y de hecho en la mayoría de los casos, no lo hará. A modo de ejemplo, una modificación solo puede ocurrir en una posición terminal 3' o 5', solo puede ocurrir en una región terminal, *por ejemplo* en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación puede ocurrir en una región de doble cadena, una región de cadena sencilla, o en ambas. Por ejemplo, una modificación con fosforotioato en una posición O no-ligada solo puede ocurrir en uno o ambos extremos, solo puede ocurrir en una región terminal, *por ejemplo*, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones de doble cadena y de cadena sencilla, particularmente en el extremo. Del mismo modo, una modificación puede ocurrir en la cadena codificante, cadena no codificante, o ambas. En algunos casos, la cadena codificante y no codificante tendrán las mismas modificaciones o la misma clase de modificaciones, pero en otros casos la cadena codificante y no codificante tendrán diferentes modificaciones, *por ejemplo*, en algunos casos puede ser deseable modificar solo una cadena, *por ejemplo* la cadena codificante.

Dos objetivos principales para la introducción de modificaciones en agentes ARNi es su estabilización dirigida hacia la degradación en entornos biológicos y la mejora de las propiedades farmacológicas, *por ejemplo* propiedades farmacodinámicas, que se describen más adelante. Otras modificaciones apropiadas a un azúcar, base, o esqueleto de un agente ARNi se describen en PCT Application No. PCT/US2004/01193, presentada el 16 de Enero del 2004. Un agente ARNi puede incluir una base que no ocurre naturalmente, tal como las bases descritas en PCT Application No. PCT/US2004/011822, presentada el 16 de Abril del 2004. Un agente ARNi puede incluir un azúcar que no ocurre naturalmente, tal como una molécula portadora cíclica no-carbohidrato. Ejemplos característicos de azúcares que no ocurren naturalmente para utilizar en agentes ARNi se describen en PCT Application No. PCT/US2004/11829, presentada el 16 de Abril 2003.

Un agente ARNi puede incluir un enlace internucleótido (*por ejemplo*, el enlace fosforotioato quiral) útil para aumentar la resistencia a la nucleasa. Además, o en la alternativa, un agente ARNi puede incluir un imitador ribosa para aumentar la resistencia a la nucleasa. Ejemplos de enlaces internucleótidos y copias de ribosas para aumentar la resistencia a la nucleasa se describen en PCT Application No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo 2004.

Un agente ARNi puede incluir monómeros y subunidades de monómeros ligando-conjugados para la síntesis de oligonucleótidos. Ejemplos de monómeros se describen en U.S. Application No. 10/916,185, presentada el 10 de Agosto del 2004.

Un agente ARNi puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en PCT Application No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo del 2004.

Un agente ARNi puede formar un complejo con una fracción anfipática. Ejemplos de fracciones anfipáticas para utilizar con agentes ARNi se describen en PCT Application No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo del 2004.

En otra modalidad, el agente ARNi puede formar un complejo con un agente de administración que cuenta con 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 capaz de atraer, *por ejemplo*, un enlace, un ácido nucleico, *por ejemplo*, a través de interacciones iónicas o electroestáticas); (b) un agente fusogénico (*por ejemplo*, un agente capaz de fusionar y/o ser transportado a través de una membrana celular); y (c) un grupo de dirección, *por ejemplo*, un agente de dirección del tejido o la célula, *por ejemplo*, un lectina, glicoproteína, lípido o proteína, *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico. Los agentes ARNi en complejo con un agente de administración se describen en PCT Application No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo del 2004.

Un agente ARNi puede tener emparejamientos no-canónicos, tales como entre las secuencias sentido y antisentido del ARNi dúplex. Ejemplos características de agentes ARNi no-canónicos se describen en PCT Application No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo del 2004.

Resistencia a la nucleasa mejorada

- 5 Un agente ARNi, *por ejemplo*, un agente ARNi que dirige alfa-ENaC, puede tener resistencia a nucleasas mejorada.

Una forma de aumentar la resistencia es identificar los sitios de escisión y modificar tales sitios para inhibir la escisión, como se describe en U.S. Application No. 60/559,917, presentada el 4 de Mayo del 2004. Por ejemplo, los dinucleótidos 5'-ua-3', 5'-ca-3', 5'-ug-3', 5'-uu-3', o 5'-cc-3' pueden servir como sitios de escisión. En ciertas modalidades, todas las pirimidinas de un agente ARNi llevan una modificación en 2', ya sea en la cadena codificante, la cadena no codificante, o ambas cadenas, y el agente ARNi por lo tanto tiene una resistencia a las endonucleasas mejorada. La resistencia a la nucleasa mejorada, también se puede lograr modificando el nucleótido en 5', dando como resultado, por ejemplo, en al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3') en donde la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido 5'-citidina-citidina-3' (5'-cc-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', como se describe en International Application No. PCT/LTS2005/018931, presentada el 27 de Mayo de 2005. El agente ARNi puede incluir al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 de tales dinucleótidos. En una modalidad preferida particularmente, el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos secuenciales 5'-ua-3' y 5'-ca-3', ya sea en la cadena codificante, la cadena no codificante, o ambas cadenas es un nucleótido modificado. Preferiblemente, el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos secuenciales 5'-ua-3', 5'-ca-3' y 5'-ug-3', ya sea en la cadena codificante, la cadena no codificante, o ambas cadenas es un nucleótido modificado. Más preferiblemente, todos los nucleótidos de pirimidina en la cadena codificante son nucleótidos modificados, y el nucleótido en 5' en todas las apariciones de los motivos secuenciales 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en la cadena no codificante son nucleótidos modificados, o cuando la cadena no codificante no comprende ninguno de los motivos 5'-ua-3' y 5'-ca-3', en todas las apariciones del motivo secuencial 5'-ug-3'.

Preferiblemente, los nucleótidos modificados en 2' incluyen, por ejemplo, una unidad ribosa modificada en 2', *por ejemplo*, el grupo 2'-hidroxilo (OH) puede ser modificado o reemplazado con un número de diferentes sustituyentes "oxi" o "desoxi".

30 Ejemplos de modificaciones del grupo 2' hidroxilo-"oxi" incluyen alcoxi o ariloxi (OR, *por ejemplo*, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; ácidos nucleicos "bloqueados" (ANB) en los cuales el 2' hidroxilo se conecta, *por ejemplo*, por un puente metileno, con el carbono en 4' del mismo azúcar ribosa; O-AMINA y aminoalcoxi, O(CH₂)_nAMINA, (*por ejemplo*, AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterocicilamino, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, o diheteroaril amino, etilendiamina, poliamino). Es de destacar que los oligonucleótidos que contienen solo el grupo metoxietilo (MOE), (OCH₂CH₂OCH₃), un derivado PEG), muestran estabilidades a la nucleasa comparables con los modificados con la modificación fuerte con fosforotioato.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (*i.e.* azúcares desoxirribosas, que son de particular importancia para las porciones salientes de ARNdc parcialmente); halo (*por ejemplo*, flúor); amino (*por ejemplo* NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterocicilil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, diheteroaril amino, o aminoácido); NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterocicilil amino, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, o diheteroaril amino), -NHC (O)R (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquil; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que opcionalmente pueden ser sustituidos con *por ejemplo*, una función amino.

45 Los sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, y 2'-fluoro.

La inclusión de azúcares de furanosa en el esqueleto de oligonucleótido también puede disminuir escisión endonucleolítica. Un agente ARNi además puede ser modificado, mediante la inclusión de un grupo catiónico en 3', o invirtiendo el nucleósido en el terminal 3' con un ligamiento 3'-3'. En otra alternativa, el terminal 3' se puede bloquear con un grupo aminoalquilo, *por ejemplo*, un 3' C5- aminoalquilo dT. Otros conjugados 3' pueden inhibir la escisión exonucleolítica 3'-5'. Aunque no se está ligado por la teoría, un conjugado 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica por bloqueo estéricamente de la exonucleasa del enlace con el extremo 3' del oligonucleótido. Incluso las cadenas pequeñas de alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, deoxirribosa, glucosa etc.) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

55 La escisión nucleolítica también se puede inhibir por la introducción de modificaciones del ligador fosfato, *por ejemplo*, ligamientos fosforotioato. Por lo tanto, los agentes preferidos de ARNi incluyen dímeros de nucleótido

enriquecidos o puros para una forma quiral particular de un grupo fosfato modificado que contiene un heteroátomo en una posición no puente normalmente ocupada por el oxígeno. El heteroátomo pueden ser S, Se, Nr_2 , o Br_3 . Cuando el heteroátomo es S, se prefiere un ligamiento Sp enriquecido o puro quiralmente. Enriquecido significa al menos 70, 80, 90, 95, o 99% de la forma preferida. Los ligamientos fosfato modificados son particularmente eficientes en la inhibición de la escisión exonucleolítica cuando se introduce cerca de las posiciones terminales 5' o 3', y preferiblemente las posiciones terminales 5', de un agente ARNi.

Los conjugados en 5' también pueden inhibir la escisión exonucleolítica 5'-3'. Aunque no se está ligado por la teoría, un conjugado en 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando estéricamente la exonucleasa del enlace con el extremo 5' del oligonucleótido. Incluso las cadenas pequeñas de grupos alquilo, arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa etc.) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

Un agente ARNi puede haber aumentado la resistencia a nucleasas cuando un agente ARNi dúplex incluye un nucleótido monocatenario protuberante en al menos un extremo. En modalidades preferidas, el nucleótido protuberante incluye 1 a 4, preferiblemente 2 a 3, nucleótidos no apareados. En una modalidad preferida, el nucleótido no apareado del monocatenario saliente que está directamente adyacente al par del nucleótido terminal contiene una base purina, y el par del nucleótido terminal es un par G-C, o al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares G-C. En otras modalidades, el nucleótido protuberante puede tener 1 o 2 nucleótidos no apareados, y en una modalidad ejemplar el nucleótido protuberante es 5'-gc-3'. En modalidades preferidas, el nucleótido protuberante está en el extremo 3' de la cadena no codificante. En una modalidad, el agente ARNi incluye el motivo 5'-cgc-3' en el extremo 3' de la cadena no codificante, de manera que se forma un saliente de 2-nt 5'-gc-3'.

Por lo tanto, un agente ARNi puede incluir modificaciones con el fin de inhibir la degradación, *por ejemplo*, por nucleasas, *por ejemplo*, endonucleasas o exonucleasas, encontradas en el cuerpo de un sujeto. Estos monómeros, en este documento se denominan como NRMs, o Monómeros promotores de la Resistencia a la Nucleasa, las modificaciones correspondientes como modificaciones NRM. En muchos casos estas modificaciones modularan otras propiedades del agente ARNi igualmente, *por ejemplo*, la capacidad para interactuar con una proteína, *por ejemplo*, una proteína de transporte, *por ejemplo*, albúmina de suero, o un miembro del RISC, o la capacidad de las primeras y segundas secuencias para formar una dúplex entre sí o para formar una dúplex con otra secuencia, *por ejemplo*, una molécula diana.

Una o más diferentes modificaciones NRM se pueden introducir en un agente ARNi o en una secuencia de un agente ARNi. Una modificación NRM se puede utilizar más de una vez en una secuencia o en un agente ARNi.

Las modificaciones NRM incluyen algunas que se pueden colocar solo en el terminal y otros que pueden ir en cualquier posición. Algunas modificaciones NRM pueden inhibir la hibridación por lo que es preferible utilizarlos solo en las regiones terminales, y es preferible no utilizarlos en el sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia que dirige un gen o secuencia tipo, particularmente en la cadena no codificante. Se pueden utilizar en cualquier lugar en una cadena codificante, siempre que se mantenga suficiente hibridación entre las dos cadenas del agente ARNi dc. En algunas modalidades es deseable colocar el NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión de una cadena codificante, ya que puede minimizar silenciamiento inespecífico.

En la mayoría de los casos, las modificaciones NRM serán distribuidas de manera diferente dependiendo de si están comprendidos en una cadena codificante o no codificante. Si en una cadena no codificante, las modificaciones que interfieren con o inhiben la escisión de la endonucleasa no se debe insertar en la región que está sujeta a la escisión mediada por RISC, *por ejemplo*, el sitio de escisión o la región de escisión (Como se describe en Elbashir et al., 2001, Genes and Dev. 15: 188, incorporada aquí por referencia). La escisión de la diana se produce aproximadamente en la mitad de una cadena no codificante de 20 o 21 nt, o aproximadamente 10 o 11 nucleótidos en dirección 5' de los primeros nucleótidos en el ARNm diana que es complementaria a la cadena no codificante. Como se utiliza en este documento el sitio de escisión se refiere a los nucleótidos en cualquiera de los lados del sitio de escisión, en la diana o en la cadena del agente ARNi que se hibrida a esta. La región de la escisión significa los nucleótidos entre 1, 2, o 3 nucleótidos del sitio de escisión, en cualquier dirección.

Tales modificaciones se pueden introducir en las regiones terminales, *por ejemplo*, en la posición terminal o con 2, 3, 4, o 5 posiciones del terminal, de una cadena codificante o no codificante.

Ligandos Atados

Las propiedades de un agente ARNi, incluyendo sus propiedades farmacológicas, se pueden influenciar y personalizar, *por ejemplo*, mediante la introducción de ligandos, *por ejemplo* ligandos atados. Además, las propiedades farmacológicas de un agente ARNi se pueden mejorar, mediante la incorporación de un ligando en una formulación del agente ARNi cuando el agente ARNi tiene o no tiene un ligando atado.

Una amplia variedad de entidades, *por ejemplo*, ligandos, se pueden atar a un agente ARNi o utilizar como aditivo o conjugado de formulación, *por ejemplo*, con el portador de una subunidad de monómero conjugado-ligando. A continuación, se describen en el contexto los ejemplos de una subunidad de monómero conjugado-ligando pero que solo se prefiere, las entidades se pueden acoplar en otros puntos a un agente ARNi.

5 Las fracciones preferidas son ligandos, que se acoplan, preferiblemente covalentemente, ya sea directa o indirectamente, a través de un correa que interviene con el portador. En las modalidades preferidas, el ligando se une con el portador *a través de* una correa que interviene. El ligando o ligando atado puede estar presente en el monómero conjugado-ligando cuando el monómero conjugado-ligando se incorpora en la cadena de crecimiento. En algunas modalidades, el ligando se puede incorporar en una subunidad monómero conjugado/ligando "precursor" después de que una subunidad de monómero conjugado-ligando "precursor" se ha incorporado en la cadena de crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, *por ejemplo*, una correa amino-terminada, *por ejemplo*, TAP-(CH₂)_nNH₂ se puede incorporar en un cadena codificante o no codificante creciente. En una posterior operación, i.e., después de la incorporación de la subunidad de monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo electrofílico, *por ejemplo*, un grupo pentafluorofenil éster o aldehído, posteriormente se puede unir al monómero precursor conjugado-ligando mediante el acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico terminal de la correa de la subunidad de monómero precursor conjugado-ligando.

En las modalidades preferidas, un ligando altera la distribución, dirección o tiempo de vida de un agente ARNi en el cual se incorpora. En las modalidades preferidas un ligando provee una mejorada afinidad para una diana seleccionada, *por ejemplo*, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, *por ejemplo*, un compartimiento celular u órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, *por ejemplo*, en comparación con una especie ausente de dicho ligando.

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

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, *por ejemplo*, para mejorar la absorción; los compuestos de diagnóstico o grupos indicadores *por ejemplo*, para el seguimiento de la distribución; agentes de entrecruzamiento; fracciones que confieren resistencia a la nucleasa; y las nucleobases naturales o inusuales. Ejemplos generales incluyen moléculas lipofílicas, lípidos, lectinas, esteroides (*por ejemplo*, uvaol, hecigenina, diosgenina), terpenos (*por ejemplo*, triterpenos, *por ejemplo*, sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol), vitaminas, carbohidratos (*por ejemplo*, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, sintético (por ejemplo, Oligo Lactato 15-mer) y polímeros naturales (por ejemplo, de peso molecular medio y bajo, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, agentes de enlace de proteínas, moléculas de dirección a la integrina, policatiónicos, péptidos, poliaminas, y imitadores de péptido. Otros ejemplos incluyen ácido fólico o ligandos del receptor de células epiteliales, tales como transferrina.

El ligando puede ser una molécula sintética o recombinante o de origen natural, tal como un polímero sintético, *por ejemplo*, un ácido poliamino sintético. Ejemplos de ácidos poliaminos incluyen polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero de estireno-ácido maleico anhídrido, copolímero poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), polivinil alcohol (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Ejemplo de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptido-poliamina, peptidomimético poliamina, dendrímero de poliamina, arginina, amidina, protamina, fracciones catiónicas, *por ejemplo*, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido alfa helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos dirigidos, por ejemplo, un agente dirigido al tejido o a la célula, por ejemplo, una tiotropina, melanotropina, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, un ácido poliamino glicosilado, transferrina, bisfosfonatos, poliglutamato, poliaspartato, o un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) o péptido mimético RGD.

Los ligandos pueden ser proteínas, *por ejemplo*, glicoproteínas, lipoproteínas, *por ejemplo* lipoproteína de baja densidad (LDL), o albúminas, *por ejemplo* albúmina de suero humano (HSA), o péptidos, *por ejemplo*, moléculas que tienen una afinidad específica para un co-ligando, o anticuerpos *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico tal como una célula cancerosa, célula endotelial, o célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También puede incluir especies no-peptídicas, tales como cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, o fucosa multivalente.

El ligando puede ser una sustancia, *por ejemplo* un fármaco, lo que puede aumentar la absorción del agente ARNi en la célula, por ejemplo, mediante la interrupción del citoesqueleto de la célula, *por ejemplo*, mediante la interrupción de microtúbulos de la célula, microfilamentos, y/o filamentos intermedios. El fármaco puede ser, por

ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jasplaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, mioservina, tetraciclina.

5 En un aspecto, el ligando es un lípido o molécula a base de lípidos. Tal lípido o molécula a base de lípidos preferiblemente se une a una proteína de suero, *por ejemplo*, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de enlace de HSA permite la distribución del conjugado con un tejido diana, *por ejemplo*, tejido hepático, incluyendo células parenquimales del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA también se pueden utilizar como ligandos. Por ejemplo, se pueden utilizar neproxin o aspirina. Un lípido o ligando a base de lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar la dirección o transporte en una célula diana o membrana celular, y/o (c) se puede utilizar para ajustar el enlace con una proteína de suero, *por ejemplo*, HSA.

10 Un ligando a base de lípidos se puede utilizar para modular, *por ejemplo*, controlar el enlace del conjugado con un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o ligando a base de lípidos que se une con HSA más fuertemente será menos probable que sea dirigido al riñón y por lo tanto menos probable que sea eliminado del cuerpo.

15 En una modalidad preferida, el ligando a base de lípidos se une con HSA. Preferiblemente, se une con HSA con una suficiente afinidad de tal manera que el conjugado preferiblemente será distribuido a un tejido no-riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que el enlace HSA-ligando no se pueda revertir.

20 En otro aspecto, el ligando es una fracción, *por ejemplo*, una vitamina o nutriente, que se ha tomado por una célula diana, *por ejemplo*, una célula proliferativa. Estas son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, del tipo maligno o no-maligno, *por ejemplo*, células cancerosas. Ejemplos las vitaminas incluyen vitamina A, E, y K. Otras vitaminas ejemplares incluyen las vitaminas B, *por ejemplo*, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes tomados por las células cancerosas.

25 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 ejemplar es un péptido tal como tat o antennapedia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, ligamientos no-peptídicos o pseudo-peptídicos, y uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal preferiblemente es un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una lipofóbica. El agente de permeación celular se puede ligar covalentemente con el agente ARNi o ser parte de un complejo ARNi-péptido.

Modificaciones 5'-Fosfato

30 En modalidades preferidas, los agentes ARNi son 5' fosforilados o incluyen un análogo fosforilo en el terminal 5' prime. Las modificaciones 5'-fosfato de la cadena no codificante incluyen aquellos que son compatibles con silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones apropiadas 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'); 5'-guanosina cap (7-metilado o no-metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-adenosina cap (Appp), y cualquier nucleótido modificado o no-modificado cap estructura (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 35 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosforoditioato ((HO)₂(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de oxígeno/azufre reemplaza el monofosfato, difosfato y trifosfatos (*por ejemplo* 5'-alfa-thiotrifosfato, 5'-gamma-thiotrifosfato, etc.), 5'-phosphoramidates ((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=alquileter=metoximetil (MeOCH₂-), etoximetil, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5'-).

40 La cadena codificante se puede modificar con el fin de inactivar la cadena codificante e impedir la formación de un RISC activo, reduciendo así, potencialmente los efectos inespecíficos. Esto se puede lograr, mediante una modificación que impide la 5'-fosforilación de la cadena codificante, *por ejemplo*, mediante la modificación con un ribonucleótido 5'-O-metilo (ver Nykänen et al., (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321). Otras modificaciones que impiden la fosforilación también se pueden 45 utilizar, *por ejemplo*, sustituyendo simplemente el 5'-OH por H en lugar de OMe. Alternativamente, un gran grupo voluminoso se puede adicionar al 5'-fosfato convirtiéndolo en un ligamiento fosfodiéster.

Nucleobases No-naturales

50 Nitropirrolil y nitroindolil son nucleobases 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 de origen natural sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión o actividad del dúplex de oligonucleótido. En contraste con la estabilización, interacciones de enlace de hidrógeno asociadas con nucleobases de origen natural, se postula que los dúplex de oligonucleótidos que contienen nucleobases 3-nitropirrolil se estabilizan únicamente mediante interacciones de apilamiento. La ausencia de interacciones significantes de enlace de hidrógeno con nucleobases nitropirrolil evita la especificidad para una base complementaria específica. Además,

diferentes informes confirman que 4-, 5- y 6-nitroindolil muestran muy poca especificidad para las cuatro bases naturales. De modo interesante, un dúplex de oligonucleótido que contiene 5-nitroindolil fue más estable que los oligonucleótidos correspondientes que contienen 4-nitroindolil y 6-nitroindolil. Los procedimientos para la preparación de 1-(2'-O-metil-β-D-ribofuranosil)-5-nitroindol se describen en Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629. Otras bases universales incluyen hipoxantina, isoinosina, 2-aza-inosina, 7-deaza-inosina, nitroimidazolil, nitropirazolil, nitrobenzimidazolil, nitroindazolil, aminoindolil, pirrolopirimidinil, y derivados estructurales de estos. Para una discusión más detallada, incluyendo procedimientos sintéticos, de nitropirrolil, nitroindolil, y otras bases universales mencionadas anteriormente ver 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., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:67-69 (2001); y Nair et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 20(4-7):735-738 (2001).

Difluorotolil es una nucleobase non-natural que funciona como una base universal. El difluorotolil es un isómero de la nucleobase natural timina. Pero a diferencia de la timina, el difluorotolil no muestra una selectividad apreciable para ninguna de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funcionan como bases universales y son susceptibles a la presente divulgación son 4-fluoro-6-metilbenzimidazol y 4-metilbenzimidazol. Además, los derivados del isocarbotirilil relativamente hidrofóbicos, 3-metil isocarbotirilil, 5-metil isocarbotirilil, y 3-metil-7-propinil isocarbotirilil son bases universales que causan solo ligera desestabilización de dúplex de oligonucleótidos en comparación con la secuencia de oligonucleótido que contiene solo bases naturales. Otras nucleobases no-naturales incluyen 7-azaindolil, 6-metil-7-azaindolil, imidizopiridinil, 9-metil-imidizopiridinil, pirrolopirazinil, isocarbotirilil, 7-propinil isocarbotirilil, propinil-7-azaindolil, 2,4,5-trimetilfenil, 4-metilindolil, 4,6-dimetilindolil, fenil, naftalenil, antraceni, fenantraceni, pirenil, stilbenil, tetraceni, pentaceni, y derivados estructurales de estos. Para una discusión más detallada, incluyendo procedimientos sintéticos, de difluorotolil, 4-fluoro-6-metilbenzimidazol, 4-metilbenzimidazol, y otras bases no-naturales mencionadas anteriormente, ver: 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 U.S. Patent No. 6,218,108.

Transporte de agentes ARNi en células

No se desea estar ligado por ninguna teoría, la similitud química entre los agentes ARNi conjugados con el colesterol y ciertos constituyentes de lipoproteínas (*por ejemplo* colesterol, ésteres del colesterol, fosfolípidos) pueden conducir a la asociación de los agentes ARNi con lipoproteínas (*por ejemplo* LDL, HDL) en sangre y/o la interacción del agente ARNi con componentes celulares que tienen una afinidad por el colesterol, *por ejemplo* los componentes de la ruta de transporte del colesterol. Las lipoproteínas así como sus constituyentes se toman y procesan por las células, mediante diferentes mecanismos de transporte pasivo y activo, *por ejemplo*, sin limitación, endocitosis de LDL unido al receptor de LDL, endocitosis de LDLs oxidados o modificados de otra manera a través de la interacción con receptor Scavenger A, la absorción del colesterol HDL mediada por el receptor Scavenger B1 en el hígado, pinocitosis, o transporte de colesterol a través de las membranas mediante ABC (casete de enlace de ATP) proteínas de transporte, *por ejemplo* ABC-A1, ABC-G1 o ABC-G4. Por lo tanto, los agentes ARNi conjugados con el colesterol podrían disfrutar de una absorción asistida mediante las células que poseen tales mecanismos de transporte, *por ejemplo* células hepáticas. Como tal, la presente divulgación provee la evidencia y los métodos generales para dirigir los agentes ARNi a las células que expresan ciertos componentes de la superficie celular, *por ejemplo* receptores, conjugando un ligando natural para dicho componente (*por ejemplo* colesterol) con el agente ARNi, o conjugando una fracción química (*por ejemplo* colesterol) con el agente ARNi que se asocia con o se une a un ligando natural para el componente (*por ejemplo* LDL, HDL).

Otras modalidades

Un agente ARNi, se puede producir en una célula *in vivo*, *por ejemplo*, a partir de plantillas de ADN exógeno que se administran en la célula. *Por ejemplo*, las plantillas de ADN se pueden insertar en vectores y utilizar como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden suministrar a un sujeto, *por ejemplo*, mediante inyección intravenosa, administración local (U.S. Pat. No. 5,328,470), o por inyección estereotáctica (*ver, 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 cual está incrustado el vehículo de administración del gen. Las plantillas de ADN, *por ejemplo*, pueden incluir dos unidades de transcripción, una que produce un transcrito que incluye la cadena superior de un agente ARNi y una que produce un transcrito que incluye la cadena inferior de un agente ARNi. Cuando las plantillas

se transcriben, se produce el agente ARNi, y se procesa en los fragmentos del agente de ARNs que median el silenciamiento génico.

Formulación

5 La presente divulgación también incluye formulaciones y composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de ARNdc. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en un número de maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona que se trata. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión; o intracraneal, por ejemplo, administración por vía intratecal o intraventricular.

15 Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables los portadores farmacéuticos convencionales, bases oleosas, en polvo o acuosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles los condones recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las cuales los ARNdc(s) están en mezcla con un agente de administración tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y agentes tensoactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleilfosfatidil etanolamina = DOPE, dimiristoilfosfatidil colina = DMPC, distearoilfosfatidil colina) negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidil glicerol = DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropil = DOTAP y dioleilfosfatidil etanolamina = DOTMA), por ejemplo (+/-)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis (dodeciloxi)-1-propanaminio bromuro = GAP-DLRIE). Los ARNdc(s) pueden ser encapsulados entre liposomas o pueden formar complejos con estos, en particular con los liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNdc(s) pueden estar formando un complejo con los lípidos, en particular con los lípidos catiónicos. Los ésteres y ácidos grasos preferidos incluyen pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido laurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un alquilo C₁₋₁₀ éster (por ejemplo isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sal de este farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones tópicas se describen con detalle en U.S. patent application Ser. No. 09/315,298 presentada el 20 de Mayo de 1999.

30 Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en agua o medio no-acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables, los aglutinantes, agentes aromatizantes, diluentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las cuales ARNdc(s) se administran en conjunto con uno o más potenciadores de penetración, agentes tensoactivos, y quelantes. Los agentes tensoactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o las sales de estos, ácidos biliares y/o las sales de estos. Las sales/ácidos biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido dehidrocólico, 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 laurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurin, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal de estos farmacéuticamente aceptable (por ejemplo sodio). También se prefieren las combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio del ácido laurico, ácido cáprico y UDCA. Otros potenciadores de penetración incluyen polioxietilén-9-lauril éter, polioxietilén-20-cetil éter. Los ARNdc(s) se pueden administrar por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secas pulverizadas, o en complejo para formar micro o nanopartículas. Los agentes formadores de complejos de ARNdc incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivadas de DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes formadores de complejo particularmente preferidos incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, poli-histidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para ARNdc(s) y su preparación se describen con detalle en U.S. application. Ser. No. 08/886,829 (presentada el 1 de Julio de 1997), Ser. No. 09/108,673 (presentada el 1 de Julio de 1998), Ser. No. 09/256,515 (presentada el 23 de Febrero de 1999), Ser. No. 09/082,624 (presentada el 21 de Mayo de 1998) y Ser. No. 09/315,298 (presentada el 20 de Mayo de 1999).

60 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener soluciones reguladoras, diluentes y otros aditivos

apropiados tales como, pero no limitando a, potenciadores de penetración, compuestos portadores y otros excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos formados previamente, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas, que convenientemente pueden estar presentes en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el portador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos divididos finamente o ambos, y a continuación, si es necesario, dando forma al producto.

Las composiciones se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no limitando a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios, y enemas. Las composiciones también se pueden formular como suspensiones en medio acuoso, no-acuoso o mezclado. Las suspensiones acuosas además pueden contener las sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una modalidad las composiciones farmacéuticas se pueden formular y utilizar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen las formulaciones tales como, pero no limitando a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Mientras que básicamente similares en la naturaleza estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones generalmente se conoce por los expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación y se puede aplicar a la formulación de las composiciones.

Emulsiones

Las composiciones se pueden preparar y formular como emulsiones. Por lo general, las emulsiones son sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro, en la forma de gotitas que usualmente exceden un diámetro de 0.1 mm (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Con frecuencia, las emulsiones son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser tanto de la variedad de agua-en-aceite (w/o) o de aceite-en-agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas diminutas en una fase oleosa a granel, la composición resultante se denomina una emulsión agua-en-aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas diminutas en una fase acuosa a granel, la composición resultante se denomina una emulsión 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 solución, ya sea en la fase acuosa, fase oleosa o por sí misma como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes, y anti-oxidantes también pueden estar presentes 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 agua-en-aceite-en-agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas con frecuencia proveen ciertas ventajas las emulsiones binarias simples no. Las emulsiones múltiples en las cuales gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Así mismo un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizada en una fase oleosa continua provee una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Con frecuencia, la fase discontinua o dispersa de la emulsión se dispersa bien en la fase continua o externa y se mantiene en esta forma a través de los medios emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión pueden ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las cremas y bases de ungüentos de diseño de emulsión. Otros medios para estabilizar las emulsiones implican el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquiera de las fases de emulsión. Los emulsionantes pueden ser ampliamente clasificados en cuatro categorías: los agentes tensoactivos sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción, y sólidos dispersos finamente (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los agentes tensoactivos sintéticos, también conocidos como surfactantes, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y han sido revisados en literatura (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los agentes tensoactivos por lo general son anfífilos y comprenden una porción hidrofílica y una hidrofóbica. La relación de la naturaleza hidrofílica con la hidrofóbica del agente tensoactivo se ha denominado el balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en agentes tensoactivos categorizados y seleccionados en la preparación de formulaciones. Los agentes tensoactivos se pueden clasificar en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrofílico: no-iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsionantes de origen natural utilizadas en formulaciones de emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas tales que pueden absorber agua para formar emulsiones w/o pero conservando sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrofílica. Los sólidos divididos finamente también han sido utilizados como buenos emulsionantes especialmente en combinación con agentes tensoactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no hinchables tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

Una gran variedad de materiales no-emulsificantes también se incluyen en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de emulsiones. Estos incluyen grasa, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrofílicos o hidrocoloides incluyen gomas de origen natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, carragenina, goma de guar, goma de Karaya, y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa, y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando fuertes películas interfaciales alrededor de las gotitas de la fase dispersa y mediante el aumento de la viscosidad de la fase externa.

Dado que las emulsiones con frecuencia contienen un número de ingredientes tales como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfátidos que fácilmente pueden soportar el crecimiento de microbios, estas formulaciones con frecuencia incorporan conservantes. Los conservantes utilizados comúnmente incluidos en las formulaciones de emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. Los antioxidantes también se adicionan comúnmente a las formulaciones de emulsión para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes utilizados pueden ser secuestrantes del radical libre tales como tocoferoles, alquilgalatos, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico, y lecitina.

La aplicación de formulaciones de emulsión a través de rutas dermatológicas, orales y parenterales y los métodos para su fabricación, han sido revisados en literatura (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones de emulsión para administración oral han sido muy ampliamente utilizadas debido a la facilidad de formulación, así como la eficacia a partir de un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Los laxantes a base de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas altas en grasa están entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.

En una modalidad, las composiciones de ARNdC(s) y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Por lo general, las microemulsiones son sistemas que se preparan en primer lugar para dispersar un aceite en una solución acuosa de agente tensoactivo y a continuación la adición de una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedio para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como termodinámicamente estables, dispersiones claras isotrópicamente de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas surfactantes (Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York,

pages 185-215). Comúnmente, las microemulsiones comúnmente se preparan a través de una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, agente tensoactivo, cosurfactante y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua-en-aceite (w/o) o aceite-en-agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y del agente tensoactivo utilizados y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas hidrocarbonadas de las moléculas de agente tensoactivo (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensamente y se ha producido un conocimiento exhaustivo, para un experto en la técnica, de como formular las microemulsiones (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 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 agentes tensoactivos utilizados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, agentes tensoactivos iónicos, agentes tensoactivos no iónicos, Brij 96, polioxietileno oleil éteres, ésteres del poliglicerol del ácido graso, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (M0310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (P0500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solos o en combinación con cosurfactantes. El cosurfactante, usualmente 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 del agente tensoactivo y por consiguiente creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de agente tensoactivo. Las microemulsiones, sin embargo, se pueden preparar sin el uso de cosurfactantes y sistemas de microemulsión auto-emulsificante libre de alcohol se conocen en la técnica. La fase acuosa por lo general puede ser, pero no se limita a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, glicoles de propileno, y derivados de etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graso, mono, di, y tri-glicéridos (C₈-C₁₂) de cadena media, ésteres de gliceril de ácido graso polioxietilado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C₈-C₁₀ poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés a partir del punto de vista de solubilización del fármaco y la mejorada absorción de fármacos. Las microemulsiones basadas en lípidos (tanto de o/w y w/o) se han propuesto para mejorar la biodisponibilidad oral de los fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones ofrecen ventajas de una mejor solubilización del fármaco, protección del fármaco de la hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción del fármaco debido a las alteraciones inducidas por el agente tensoactivo en la permeabilidad y fluidez de la membrana, la facilidad de preparación, facilidad de administración por vía oral sobre las formas de dosificación sólidas, la mejora de potencia clínica, y disminución de la toxicidad (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Con frecuencia, las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se ponen juntos a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o ARNdc(s). Las microemulsiones también han sido efectivas en la administración transdérmica de los componentes activos en ambas aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión faciliten el aumento de la absorción sistémica de ARNdc(s) y los ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal, así como mejorar la absorción celular local de ARNdc(s) y los ácidos nucleicos entre el tracto gastrointestinal, la vagina, la cavidad bucal y otras zonas de administración.

Las microemulsiones también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol, y potenciadores de penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para mejorar la absorción de los ARNdc(s) y los ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de penetración utilizados en las microemulsiones se pueden clasificar como pertenecientes a uno de cinco agentes tensoactivos de categorías amplias, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no quelantes agentes no-tensoactivos (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha discutido anteriormente.

Liposomas

Existen muchas estructuras de agente tensoactivo organizadas además de microemulsiones que han sido estudiadas y utilizadas para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han despertado gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración del fármaco. El término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfífilicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición que se administra. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse con la pared celular. Los liposomas no-catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficientemente con la membrana celular, se toman por macrófagos in vivo.

5 Con el fin de atravesar la piel intacta del mamífero, las vesículas de lípidos deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico apropiado. Por lo tanto, es deseable utilizar un liposoma que sea altamente deformable y capaz de pasar a través de tales poros finos.

10 Otras ventajas de los liposomas incluyen; liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio rango de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger a los fármacos encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga de superficie del lípido, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

15 Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican con un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares y como la fusión del liposoma y célula progresa, los contenidos liposomales se vacían en la célula donde el agente activo puede actuar.

20 Las formulaciones liposomales han sido el foco de la investigación efectiva como el modo de administración para muchos fármacos. Existe una creciente evidencia de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en el objetivo deseado, y la capacidad para administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrofílicos e hidrofóbicos, en la piel.

25 Varios informes han detallado la capacidad de liposomas para administrar los agentes incluyendo ADN de alto peso molecular en la piel. Los compuestos incluyendo analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADNs de alto peso molecular han sido administrados a la piel. La mayoría de las aplicaciones resultan en la dirección de la epidermis superior

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

35 Los liposomas que son sensibles al pH o cargados negativamente, atrapan ADN en lugar del complejo con este. Dado que ambos el ADN y el lípido se cargan de forma similar, se produce repulsión en lugar de formación de complejo. No obstante, algo de ADN se atrapa dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH han sido utilizados para administrar el ADN que codifica el gen de la timidina quinasa a las monocapas celulares en el cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

40 Un principal tipo de composición liposomal incluye fosfolípidos distintos de fosfatidilcolina derivada naturalmente. Las composiciones de liposoma neutrales, por ejemplo, se pueden formar a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposoma aniónico generalmente se forman a partir de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que liposomas fusogénicos aniónicos se forman en primer lugar a partir de dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposomal se forma a partir de la fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o
45 fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado la administración tópica de formulaciones de fármaco liposomal a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a la piel del conejillo de indias resultan en una reducción de llagas herpéticas de la piel mientras que la administración del interferón a través de otros medios (por ejemplo como una solución o como una emulsión) no fueron efectivos (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional probó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal a la administración de interferón utilizando un sistema acuoso, y se concluyó que la formulación liposomal fue superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).
50

Los sistemas liposomales no-iónicos también han sido examinados para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden agente tensoactivo no-iónico y colesterol. Las

formulaciones liposomales no-iónicas que comprenden Novasome.TM. I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) y Novasome.TM. II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) fueron utilizadas para administrar ciclosporina-A en la dermis de la piel del ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposomales no-iónicos fueron efectivos para facilitar la deposición de la 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", un término que, como se utiliza en este documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado una mejorada vida útil en circulación con respecto a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los cuales parte de la porción del lípido que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliosido Gm1, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrofílicos, tales como una fracción de polietilenglicol (PEG). Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría particular, se cree en la técnica que, al menos para los liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina, o lípidos derivados de PEG, la mejorada vida media en circulación de estos liposomas estabilizados estéricamente deriva de una absorción reducida en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Varios liposomas que comprenden uno o más glicolípidos se conocen en la técnica. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) reportaron la capacidad del monosialogangliosido Gm1, galactocerebrósido sulfato y fosfatidilinositol para mejorar la vida media en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). U.S. Pat. No. 4,837,028 y WO 88/04924, ambas para Allen et al., revelan los liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido Gm1 o un galactocerebrósido sulfato éster. U.S. Pat. No. 5,543,152 (Webb et al.) revela los liposomas que comprenden la esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se revelan en WO 97/13499 (Lim et al).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrofílicos, y los métodos de preparación de estos, se conocen en la técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describen los liposomas que comprenden un detergente no-iónico, 2C1215G, que contiene una fracción de PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrofílico de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da lugar a una vida media en sangre significativamente mejor. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (U.S. Pat. Nos. 4,426,330 y 4,534,899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describen los experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato PEG tienen aumentos significantes de la vida media en circulación sanguínea. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) prolongaron tales observaciones a otros fosfolípidos derivados de PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen fracciones de PEG unidas covalentemente en su superficie externa se describen en European Patent No. EP 0 445 131 B1 y WO 90/04384 para Fisher. Las composiciones de liposoma que contienen 1-20 por ciento molar de PE derivatizado con PEG, y los métodos de uso de este, se describen por Woodle et al. (U.S. Pat. Nos. 5,013,556 y 5,356,633) y Martin et al. (U.S. Pat. No. 5,213,804 y European Patent No. EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden un número de otros conjugados lípido-polímero se revelan en WO 91/05545 y U.S. Pat. No. 5,225,212 (ambas para Martin et al.) y en WO 94/20073 (Zalipsky et al.) Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificado con PEG se describen en WO 96/10391 (Choi et al). U.S. Pat. No. 5,540,935 (Miyazaki et al.) y U.S. Pat. No. 5,556,948 (Tagawa et al.) describe liposomas que contienen PEG que además se pueden derivatizar con fracciones funcionales sobre sus superficies.

Un número de liposomas limitado que comprende ácidos nucleicos se conoce en la técnica. WO 96/40062 para Thierry et al. revela los métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. U.S. Pat. No. 5,264,221 para Tagawa et al. revela liposomas unidos a la proteína y sostiene que los contenidos de tales liposomas pueden incluir ARNdc. U.S. Pat. No. 5,665,710 para Rahman et al., describe ciertos métodos de encapsulación de oligodesoxinucleotidos en liposomas. WO 97/04787 para Love et al., revela los liposomas que comprende ARNdc(s) dirigido al gen raf.

Los transfersomas son incluso otro tipo de liposomas, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármacos. Los transfersomas se pueden describir como gotitas de lípidos que son tan altamente deformables que fácilmente son capaces de penetrar a través de poros que son más pequeñas que la gotita. Los transfersomas son adaptables al medio ambiente en el cuales se utilizan, por ejemplo son auto-optimizantes (adaptables a la forma de los poros en la piel), autoreparadoras, con frecuencia alcanzan sus objetivos sin fragmentación, y con frecuencia autocargadoras. Para hacer los transfersomas es posible adicionar activadores de borde de la superficie, usualmente agentes tensoactivos, a una composición liposomal estándar. Los transfersomas han sido utilizados para administrar albúmina de suero a la piel. Se ha demostrado que la administración de albúmina de suero mediada por el transfersoma es tan efectiva como la inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina de suero.

Los agentes tensoactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La forma más común de clasificar y jerarquizar las propiedades de los muchos diferentes tipos de agentes tensoactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del balance hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") provee los medios más útiles para catalogar los diferentes agentes tensoactivos utilizados en las formulaciones (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de agente tensoactivo no se ioniza, esta se clasifica como un agente tensoactivo no-iónico. Los agentes tensoactivos no-iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son útiles sobre un amplio rango de valores de pH. En general sus valores de HLB oscilan de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los agentes tensoactivos no-iónicos incluyen ésteres no-iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, gliceril ésteres, poligliceril ésteres, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Alcanolamidas no-iónicas y éteres tales como etoxilatos de alcohol graso, alcoholes propoxilados, y polímeros bloqueados etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los agentes tensoactivos polioxietileno son los miembros más populares de la clase de agente tensoactivo no-iónico.

Si la molécula de agente tensoactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o se dispersa en agua, el agente tensoactivo se clasifica como aniónico. Los agentes tensoactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acil lacilatos, acil amidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como sulfonatos de alquilbenceno, acil isetionatos, acil tauratos y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de agente tensoactivo aniónico son los sulfatos de alquilo y los jabones.

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

Si la molécula de agente tensoactivo tiene la capacidad para portar ya sea una carga positiva o negativa, el agente tensoactivo se clasifica como anfotérico. Los agentes tensoactivos anfotéricos incluyen derivados del ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

El uso de agentes tensoactivos en productos farmacéuticos, formulaciones y en emulsiones se ha revisado (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Potenciadores de Penetración

En una modalidad, la presente divulgación emplea diferentes potenciadores de penetración para producir la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente ARNdc(s), a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución en ambas formas ionizadas y no ionizadas. Sin embargo, usualmente solo los fármacos solubles en lípidos o lipofílicos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no-lipofílicos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se cruza se trata con un potenciador de penetración. Además de ayudar la difusión de fármacos no-lipofílicos a través de membranas celulares, los potenciadores de penetración también realzan la permeabilidad de fármacos lipofílicos.

Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, i.e., agentes tensoactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y agentes no-tensoactivos no-quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de potenciadores de penetración se describe a continuación con mayor detalle.

Los agentes tensoactivos: En relación con la presente divulgación, los agentes tensoactivos (o "agentes surfactantes") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión superficial de la solución o la tensión interfases entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado que la absorción de ARNdc(s) a través de la mucosa se mejora. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, estos potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, sodio lauril sulfato, polioxietileno-9-lauril éter y polioxietileno-20-cetil éter) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicos, tales como FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Los ácidos grasos: Varios ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido laurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleil-rac-glicerol), dilaurin, ácido caprílico, ácido araquidónico, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo C₁ - C₁₀ de estos (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo), y mono- y di-glicéridos de estos (i.e., oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic

Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; E1 Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

5 Sales biliares: El papel fisiológico de la bilis incluye la facilitación de dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Varias sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de penetración. Por lo tanto, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes de la bilis de origen 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 dehidrocólico (dehidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodeoxicolato 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 polioxietileno-9-lauril éter (POE) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 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).

20 Agentes Quelantes: Los agentes quelantes, se pueden definir como compuestos que eliminan los iones metálicos de una solución mediante la formación de complejos con estos, con el resultado que la absorción de ARNdc(s) a través de la mucosa se mejora. Con respecto a su uso como potenciadores de penetración, los agentes quelantes tienen la ventaja adicional de servir también como inhibidores ADNasa, ya que la mayoría de nucleasas de ADN caracterizadas requieren un ion metálico divalente para la catálisis y por lo tanto son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes incluyen pero no se limitan a etilendiaminatetraacetato disódica (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acil del colágeno, laureth-9 y derivados N-amino acil de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

30 Agentes no-tensoactivos no-quelantes: Como se utiliza en este documento, los compuestos potenciadores de la penetración de agentes no-tensoactivos no-quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como agentes tensoactivos pero que no obstante realzan la absorción de ARNdc(s) a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados 1-alquil- y 1-alquenilazacilo-alcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); y agentes anti-inflamatorios no-esteroidales tal como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Agentes que realzan la absorción de ARNdc(s) al nivel celular también se pueden adicionar a las composiciones farmacéuticas y otras. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tales como lipofectina (Junichi et al, U.S. Pat. No. 5,705,188), derivados catiónicos de glicerol, y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo et al., PCT Application WO 97/30731) y otros péptidos, también se conocen para mejorar la absorción celular de ARNdc(s).

40 Otros agentes pueden ser utilizados para mejorar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tal como 2-pirrol, azones, y terpenos tales como limoneno y mentona.

Portadores

45 Ciertas composiciones también incorporan los compuestos portadores en la formulación. Como se utiliza en este documento, "compuesto portador" o "portador" se puede referir a un ácido nucleico, o análogo de este, que es inerte (i.e., no posee actividad biológica per se) pero se reconoce como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico activo biológicamente o la promoción de su eliminación a partir de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto portador, por lo general con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculares, presumiblemente debido a la competición entre el compuesto portador y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNdc parcialmente fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-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 contraste con un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un solvente, agente de suspensión farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo inerte farmacológicamente para la administración de uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la manera planeada de administración en mente, de tal manera que proporcione la consistencia, para el volumen deseado, etc., 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 enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otras azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil celulosa, poliacrilatos o fosfato hidrógeno de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílica, dióxido de silicón coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón de sodio glicolato, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.).

Excipiente orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable apropiado para la administración no-parenteral que no reaccionan perjudicialmente con los ácidos nucleicos también se pueden utilizar para formular las composiciones. Los portadores farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones 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 soluciones acuosas estériles y no-estériles, soluciones no-acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceites líquidos o sólidos. Las soluciones también pueden contener soluciones reguladoras, diluentes y otros aditivos apropiados. Se pueden utilizar, los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables apropiados para la administración no-parenteral que no reaccionan perjudicialmente con los ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Composiciones farmacéuticas para la administración a las vías respiratorias

Otro aspecto provee para la administración de agentes ARNi a las vías respiratorias, particularmente para el tratamiento de fibrosis quística. Las vías respiratorias incluyen las vías respiratorias superiores, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguido por las vías respiratorias inferiores, que incluyen la tráquea seguido por bifurcaciones en los bronquios y bronquiolos. Las vías respiratorias inferiores y superiores se llaman las vías respiratorias conductoras. Los bronquiolos terminales luego se dividen en bronquiolos respiratorios que luego conducen a la última zona respiratoria, los alvéolos, o pulmón profundo. El epitelio de las vías respiratorias conductoras es el objetivo primario de aerosoles terapéuticos inhalados para la administración de agentes ARNi tales como agentes ARNi de alfa-ENaC.

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

La administración pulmonar se puede lograr mediante diferentes enfoques, incluyendo el uso de formulaciones nebulizadas, en aerosol, micelares y a base de polvo seco; la administración por inhalación puede ser oral y/o nasal. La administración se puede lograr con nebulizadores líquidos, inhaladores a base de aerosoles, y dispositivos de dispersión de polvo seco. Se prefieren los dispositivos de dosis fija. Uno de los beneficios de usar un atomizador o inhalador es que el potencial para la contaminación se minimiza debido a que los dispositivos son independientes. Los dispositivos de dispersión en polvo seco, por ejemplo, administrar los fármacos que se pueden formular fácilmente como polvos secos. Una composición de ARNi se puede almacenar establemente como polvos liofilizados o secados por aspersión por sí mismos o en combinación con portadores en polvo apropiados. La administración de una composición por inhalación puede ser mediada por un elemento de medición del tiempo de dosificación que puede incluir un cronómetro, un contador de dosis, dispositivo de medición del tiempo, o un indicador del tiempo que cuando se incorpora en el dispositivo permite seguimiento de la dosis, vigilancia del cumplimiento, y/o desencadenante de la dosis a un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

Ejemplos de dispositivos farmacéuticos para la administración en aerosol incluyen inhaladores de dosis fija (MDIs), inhaladores de polvo seco (DPIs), y nebulizadores de chorro de aire. Ejemplos de sistemas de administración por inhalación que se puede adaptar fácilmente para la administración de los agentes ARNi del sujeto se describen en, por ejemplo, U.S. Pat. Nos. 5,756,353; 5,858,784; y PCT applications WO98/31346; WO98/10796; WO00/27359; WO01/54664; WO02/060412. Otras formulaciones en aerosol que se pueden utilizar para la administración de los

agentes ARNi se describen en U.S. Pat. Nos. 6,294,153; 6,344,194; 6,071,497, y PCT applications WO02/066078; WO02/053190; WO01/60420; WO00/66206. Además, los métodos para la administración de agentes ARNi se pueden adaptar de aquellos utilizados en la administración de otros oligonucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) por 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 llamados "pro-fármacos", i.e. formulaciones o modificaciones químicas de una sustancia terapéutica que requieren algunas formas de procesamiento o transporte por los sistemas innatos al organismo del sujeto para liberar la sustancia terapéutica, preferiblemente en el sitio donde su acción se desea; esta última modalidad se puede utilizar en conjunto con la administración de las vías respiratorias, pero también junto con otras modalidades de la presente divulgación. Por ejemplo, los pulmones humanos pueden quitar o degradar rápidamente aerosoles depositados escindible hidrolíticamente durante periodos que oscilan de minutos a horas. En las vías respiratorias superiores, el epitelio ciliado contribuye al "escalador mucociliar" por el cual las partículas se arrastran de las vías respiratorias hacia la boca. Pavia, D., "Lung Mucociliary Clearance," in *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S. W. and Pavia, D., Eds., Butterworths, London, 1984. En los pulmones profundos, los macrófagos alveolares son capaces de fagocitar las 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," in *The Reticuloendothelial System*, S. M. Reichard and J. Filkins, Eds., Plenum, New York., pp. 315-327, 1985.

En modalidades preferidas, particularmente cuando se desea una dosificación sistémica con el agente ARNi, los agentes ARNi en aerosol se formulan como micropartículas. Las micropartículas que tienen un diámetro de entre 0.5 y diez micras pueden penetrar los pulmones, pasando a través de la mayoría de las barreras naturales. Un diámetro de menos de diez micras se requiere para pasar de largo la garganta; un diámetro de 0.5 micras o más se requiere para evitar ser exhalado.

Otros Componentes

Las composiciones adicionalmente pueden contener otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos por la técnica. De tal manera, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales activos farmacéuticamente, compatibles, adicionales, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes anti-inflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación físicamente de diferentes formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se adicionan, no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales de influencia de la presión osmótica, soluciones reguladoras, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan perjudicialmente con el o los ácidos nucleicos de la formulación.

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

Ciertas modalidades proveen composiciones y combinaciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más agentes de ARNdc y (b) uno o más otros agentes terapéuticos que funcionan mediante un mecanismo de interferencia de no-ARN.

Por consiguiente, la divulgación incluye una combinación de un ARNi con una sustancia farmacéutica anti-inflamatoria, broncodilatadora, antihistamínica, anti-tusiva, antibiótica o ADNasa, dicho bloqueador del canal de sodio epitelial y dicha sustancia farmacéutica estando en la misma o diferente composición farmacéutica.

Antibióticos apropiados incluyen antibióticos macrólidos, por ejemplo, tobramicina (TOBI™).

Las sustancias farmacéuticas ADNasa apropiadas incluyen dornasa alfa (Pulmozyme™), una solución de desoxirribonucleasa I humana recombinante (rhADNasa) altamente-purificada, que escinde selectivamente el ADN. La dornasa alfa se utiliza para tratar la fibrosis quística.

Otras combinaciones útiles de bloqueadores de canal de sodio epitelial con fármacos anti-inflamatorios son aquellas con antagonistas de receptores de la quimiocina, 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 del CCR-5, tales como los antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; antagonistas de Takeda, tales

como *N*-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metil-fenil)-5Hbenzo-ciclohepten-8-il]carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahidro-*N,N*dimetil-2*H*-piran-4-amin-io cloruro (TAK-770); y los antagonistas del CCR-5 descritos en USP 6,166,037 (particularmente en las reivindicaciones 18 y 19), WO 00/66558 (particularmente la reivindicación 8), WO 00/66559 (particularmente reivindicación 9), WO 04/018425 y WO 04/026873.

5 Los fármacos anti-inflamatorios apropiados incluyen esteroides, en particular, glucocorticoesteroides, tales como budesónida, dipropionato de beclametasona, propionato de fluticasona, ciclesonida o furoato de mometasona, o los esteroides descritos en WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (especialmente aquellos 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 del receptor glucocorticoide no-esteroideo, tales como los descritos en DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143,

10 WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 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
15 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/LTM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y los revelados en 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
20 04/045607 y WO 04/037805; antagonistas del receptor A₂B de la adenosina tales como los descritos en WO 02/42298; y los agonistas del beta-2 adrenoceptor, tales como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol fenoterol, procaterol, y especialmente, formoterol, carmoterol y las sales de estos farmacéuticamente aceptables, y los compuestos de fórmula (I) (en forma libre o de sal o solvato) de WO 0075114, preferiblemente los compuestos de los Ejemplos del mismo, especialmente indacaterol y las sales de este farmacéuticamente
25 aceptables, así como los compuestos de fórmula (I) (en forma libre o de sal o solvato) de WO 04/16601, y también los compuestos de EP 1440966, JP 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
30 04/108765 y WO 04/108676.

Fármacos broncodilatadores apropiados incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular, bromuro de ipatropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi), y glicopirrolato, pero también los descritos en 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.

35 Los fármacos anti-inflamatorios y broncodilatadores duales apropiados incluyen antagonistas muscarínicos/agonistas de beta-2 adrenoceptor dobles tales como los revelados en USP 2004/0167167, WO 04/74246 y WO 04/74812.

Las sustancias farmacéuticas antihistamínicas apropiadas incluyen cetirizina clorhidrato, acetaminofen, clemastina fumarato, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como los revelados en JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

Otras combinaciones útiles de agentes con fármacos anti-inflamatorios son aquellas con antagonistas de receptores de la quimiocina, 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 los antagonistas del CCR-5, tales como los antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; los antagonistas de Takeda, tales como *N*-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metilfenil)-5*H*-benzo-ciclohepten-8-il] carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahidro-*N,N*-dimetil-2*H*-piran-4-amin-io cloruro (TAK-770), y antagonistas del CCR-5 descritos en 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.

50 Otros agentes terapéuticos adicionales útiles también pueden ser seleccionados del grupo que consiste de moléculas de enlace de la citoquina, particularmente los anticuerpos de otras citoquinas, en particular una combinación con un anticuerpo anti-IL4, tal como se describe en PCT/EP2005/00836, un anticuerpo anti-IgE, tal como Xolair®, un anticuerpo anti-IL31, en anticuerpo anti-IL31R, un anticuerpo anti-TSLP, un anti-TSLP receptor anticuerpo, un anticuerpo anti-endoglina, un anticuerpo anti-IL1b o un anticuerpo anti-IL13, tal como se describe en
55 WO05/007699.

Dos o más compuestos combinados se pueden utilizar juntos en una sola formulación, por separado, de forma concomitante o secuencialmente.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar, mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal al 50% de la población) y la ED50 (la dosis efectiva terapéuticamente en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para utilizar en humanos. La dosificación de composiciones se encuentra generalmente dentro un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la divulgación, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos de animales para lograr un rango de concentración de plasma 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 IC50 (i.e., la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, como se discutió anteriormente, los ARNdc(s) se pueden administrar en combinación con otros agentes efectivos conocidos en el tratamiento de trastornos relacionados con ENaC. En cualquier caso, el médico encargado puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de ARNdc sobre la base de los resultados observados utilizando mediciones estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritos en este documento.

Métodos de tratamiento y Rutas de administración

Una composición que incluye un agente ARNi, *por ejemplo*, un agente ARNi que se dirige a alfa-ENaC, se puede administrar a un sujeto mediante una variedad de rutas para lograr ya sea la administración local al sitio de acción o la administración sistémica al sujeto. Ejemplos de rutas incluyen administración local directa al sitio de tratamiento, tal como los pulmones y senos nasales así como administración intravenosa, nasal, oral, y ocular. El medio preferido de administración de los agentes ARNi es a través de la administración directa a los pulmones y senos nasales como una solución líquida, en aerosol o nebulizada.

Las formulaciones para administración por inhalación o parenteral son bien conocidos en la técnica. Dicha formulación puede incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener soluciones reguladoras, diluentes y otros aditivos apropiados. Para uso intravenoso, la concentración total de solutos debe ser controlada para volver la preparación isotónica.

Los compuestos activos revelados en este documento se administran preferiblemente al pulmón(es) o senos nasales de un sujeto por cualquier medio apropiado. Los compuestos activos se pueden administrar mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables que comprenden el compuesto activo o los compuestos activos, que el sujeto inhala. El compuesto activo puede estar en aerosol en una variedad de formas, tales como, pero no limitando a, inhalantes de polvo seco, inhalantes de dosis medidas, o suspensiones líquido/líquido. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas opcionalmente pueden contener otros ingredientes terapéuticos tales como amilorida, benzamil o fenamil, con el compuesto seleccionado incluido en una cantidad efectiva para inhibir la reabsorción de agua de secreciones mucosas de las vías respiratorias, como se describe en U.S. Pat. No. 4,501,729.

La composición farmacéutica particulada opcionalmente se puede combinar con un portador para ayudar en la dispersión o transporte. Un portador apropiado tal como un azúcar (i.e., lactosa, sacarosa, trehalosa, manitol) se puede mezclar con el compuesto activo o los compuestos activos en cualquier relación apropiada (por ejemplo, una relación 1 a 1 en peso).

Las partículas que comprenden el compuesto activo deben incluir partículas de tamaño respirable, es decir, partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la boca o nariz y laringe tras la inhalación y en los bronquios y alveolos de los pulmones. En general, las partículas que oscilan de aproximadamente 1 a 10 micras de tamaño (más particularmente, menos de aproximadamente 5 micras de tamaño) son respirables. Las partículas de tamaño no-respirable que se incluyen en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y se ingieren, y la cantidad de partículas no-respirables en el aerosol preferiblemente se minimiza. Para la administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula en el rango de 10-500 μm para asegurar la retención en la cavidad nasal.

Las composiciones farmacéuticas líquidas del compuesto activo para producir un aerosol se puede preparar combinando el compuesto activo con un vehículo apropiado, tal como agua estéril libre de pirógenos. Las soluciones

salinas hipertónicas utilizadas preferiblemente son estériles, soluciones libres de pirógenos, que comprenden de uno a quince por ciento (en peso) de la sal fisiológicamente aceptable, y más preferiblemente de tres a siete por ciento en peso de la sal fisiológicamente aceptable.

5 Aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto activo se pueden producir por cualquier medio apropiado, tal como con un nebulizador a chorro accionado a presión o un nebulizador ultrasónico. Ver, por ejemplo, U.S. Pat. No. 4,501,729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una niebla de aerosol terapéutico ya sea por medio de la aceleración de gas comprimido, por lo general aire o oxígeno, a través de un orificio de venturi estrecho o por medio de agitación ultrasónica.

10 Las formulaciones apropiadas para utilizar en nebulizadores consisten del ingrediente activo en un portador líquido, el ingrediente activo que comprende hasta 40% de peso/peso de la formulación, pero preferiblemente menos de 20% peso/peso. El portador por lo general es agua (y más preferiblemente agua estéril, libre de pirógenos) o una solución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente preparada isotónica, pero puede ser hipertónica con fluidos corporales por la adición, por ejemplo, de cloruro de sodio. Aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se hace estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes reguladores y agentes tensoactivos.

Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto activo así mismo se pueden producir con cualquier generador de aerosol terapéutico de partículas sólidas. Los generadores de aerosol para administrar agentes terapéuticos de partículas sólidas 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 velocidad apropiada para la administración en humanos. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol de partículas sólidas es un insuflador. Las formulaciones apropiadas para administrar, mediante insuflación incluyen polvos finamente divididos que se pueden administrar por medio de un insuflador o incorporar en la cavidad nasal en la forma de una inhalación. En el insuflador, el polvo (por ejemplo, una dosis medida del mismo efectiva para llevar a cabo los tratamientos descritos en este documento) se contiene en cápsulas o cartuchos, por lo general hecha de gelatina o plástico, que se perforan o abren in situ y el polvo administrado por aire aspirado a través del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba operada manualmente. El polvo empleado en los insufladores consiste ya sea únicamente del ingrediente activo o de una mezcla de polvos que comprende el ingrediente activo, un diluyente del polvo apropiado, tal como lactosa, y un agente tensoactivo opcional. El ingrediente activo por lo general comprende de 0.1 a 100 peso/peso de la formulación.

Un segundo tipo de generador aerosol ilustrativo comprende un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados, que por lo general contienen una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante el uso estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido, por lo general de 10 a 200 ul, para producir un pulverizador de partículas finas que contienen el ingrediente activo. Los propelentes apropiados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de estos. La formulación adicionalmente puede contener uno o más co-solventes, por ejemplo, etanol, agentes tensoactivos, tal como ácido oleico o sorbitán trioleato, antioxidantes y agentes aromatizantes apropiados.

Un agente ARNi se puede incorporar en las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una o más especies de un agente ARNi y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en este documento el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" tiene la intención de incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y los agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de este en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La administración se puede proveer, por el sujeto o por otra persona, *por ejemplo*, un cuidador. Un cuidador se pueden cualquier entidad relacionada con la prestación de cuidados al ser humano: por ejemplo, un hospital, hospicio, consultorio médico, clínica ambulatoria; un trabajador de la salud tal como un médico, enfermera, u otro profesional; o un cónyuge o tutor, tal como un padre. La medicación se puede proveer en dosis medidas o en un dispensador que libera una dosis medida.

El término "cantidad efectiva terapéuticamente" es la cantidad presente en la composición que se necesita para proveer el nivel deseado del fármaco en el sujeto que se trata para dar la respuesta fisiológica anticipada.

55 El término "cantidad efectiva fisiológicamente" es la cantidad administrada a un sujeto para dar el efecto curativo o paliativo deseado.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa que el portador se puede tener en los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significantes en los pulmones.

5 El término "co-administración" se refiere a la administración a un sujeto de dos o más agentes, y en particular dos o más agentes ARNi. Los agentes pueden estar contenidos en una composición farmacéutica única y se administran al mismo tiempo, o los agentes pueden estar contenidos en una formulación por separado y se administran en serie a un sujeto. En tanto que los dos agentes se pueden detectar en el sujeto al mismo tiempo, se dice que los dos agentes se coadministran.

10 Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portadores incluyen estabilizantes tales como albúmina de suero humano (HSA), agentes de carga tales como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; ajustadores de pH o soluciones reguladoras; sales tales como cloruro de sodio; y similares. Estos portadores pueden ser en una forma cristalina o amorfa o pueden ser una mezcla de los dos.

15 Los agentes de carga que son particularmente valiosos incluyen carbohidratos compatibles, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones de estos. Los carbohidratos apropiados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-.beta.-ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos, y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol, y similares. Un grupo preferido de carbohidratos incluye lactosa, trehalosa, rafinosa maltodextrinas, y manitol. Los polipéptidos apropiados incluyen aspartame. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, siendo preferida la glicina.

20 Los ajustadores de pH o las soluciones reguladoras apropiados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de bases y ácidos orgánicos, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, y similares; se prefiere el citrato de sodio.

Dosificación

25 Un agente ARNi se puede administrar a una dosis unitaria menor de aproximadamente 75mg por kg de peso corporal, o menor de aproximadamente 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, o 0.0005 mg por kg de peso corporal, y menos de 200 nmol de agente ARNi (*por ejemplo*, aproximadamente 4.4×10^{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 ARNi por kg de peso corporal. La dosis unitaria, *por ejemplo*, se puede administrar por inyección (*por ejemplo*, intravenosa o intramuscular, intratecal, o directamente en un órgano), una dosis inhalada, o una aplicación tópica.

30 La dosificación puede ser en una cantidad efectiva para tratar o previene una enfermedad o trastorno. Se puede administrar profilácticamente o como la principal o una parte de un protocolo de tratamiento.

35 En una modalidad, la dosis unitaria se administra menos frecuentemente que una vez al día, *por ejemplo*, menos de cada 2, 4, 8 o 30 días. En otra modalidad, la dosis unitaria no se administra con una frecuencia (*por ejemplo*, no una frecuencia regular). *Por ejemplo*, la dosis unitaria se puede administrar una sola vez. Debido a que el silenciamiento mediado por un agente ARNi puede persistir durante varios días después de la administración del agente de la composición de ARNi, en muchos casos, es posible administrar la composición con una frecuencia menor de una vez por día, o, para algunos casos, solo una vez para el régimen total de la terapia.

40 En una modalidad, un sujeto se administra con una dosis inicial, y una o más dosis de mantenimiento de un agente ARNi, *por ejemplo*, un agente ARNi de doble cadena, o agente de ARNsi, (*por ejemplo*, un precursor, *por ejemplo*, un agente ARNi más grande que se pueda procesar en un agente de ARNsi, o un ADN que codifica un agente ARNi, *por ejemplo*, un agente ARNi de doble cadena, o agente de ARNsi, o precursor de este). La o las dosis de mantenimiento generalmente son menores que la dosis inicial, *por ejemplo*, menos de la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir el tratamiento del sujeto con una(s) dosis oscila(n) de 0.01 a 75 mg/kg de peso corporal por 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, o 0.0005 mg por kg de peso corporal por día. La dosis de mantenimiento se administra preferiblemente no más de una vez cada 45 5, 10, o 30 días. Además, el régimen de tratamiento puede durar por un periodo de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, su severidad y la condición general del paciente. En modalidades preferidas la dosificación se puede administrar no más de una vez por día, *por ejemplo*, no más de una vez por 24, 36, 48, o más horas, *por ejemplo*, no más de una vez cada 5 o 8 días. Después del tratamiento, el paciente se puede monitorear para cambios en su condición y para el alivio de los síntomas del estado de la enfermedad. La dosificación del compuesto puede ser aumentada ya sea en el caso de que el paciente no responda 50 significativamente a los niveles de dosificación corrientes, o la dosis se puede disminuir si se observa un alivio de los síntomas del estado de la enfermedad, si el estado de la enfermedad se ha extirpado, o si se observan efectos secundarios no deseados.

La dosis efectiva se puede administrar en una dosis única o en dos o más dosis, según se desee o se considere apropiado bajo las circunstancias específicas. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, implante de un dispositivo de administración puede ser aconsejable, *por ejemplo*, una bomba, stent semi-permanente (*por ejemplo*, intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular), o depósito.

- 5 Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el compuesto se administra en dosis de mantenimiento, oscilan de 0.001 g a 100 g por kg de peso corporal (ver US 6,107,094).

10 La concentración de la composición del agente ARNi es una cantidad suficiente que es efectiva en el tratamiento o prevención de un trastorno o para regular una condición fisiológica en humanos. La concentración o cantidad de agente ARNi administrada dependerá de los parámetros determinados por 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 ingredientes con el fin de evitar la irritación o ardor de los senos nasales. Algunas veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces con el fin de proveer una formulación nasal apropiada.

15 Ciertos factores pueden influir la dosificación requerida para tratar efectivamente un sujeto, incluyendo pero no limitando a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamiento previo, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. También será apreciado que la dosificación efectiva de un agente ARNi tal como un ARNsi utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar y ser evidentes de los resultados de ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, el sujeto se puede monitorear después de la administración de un agente de composición de ARNi.

20 Basándose en la información del seguimiento, una cantidad adicional de la composición del agente ARNi se puede administrar.

25 La dosificación depende de la severidad y capacidad de la condición de la enfermedad que se trata, con el transcurso de tratamiento que dura varios días a varios meses, o hasta que se ocasiona una cura o se logra una disminución del estado de la enfermedad. Los programas de dosificación óptima se pueden calcular de las mediciones de acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y velocidades de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, y generalmente se puede estimar basándose en las EC50s encontradas que son efectivas en modelos de animales *in vitro* e *in vivo* como se describe anteriormente.

- 30 Los agentes ARNi como se describe en este documento pueden ser útiles en el tratamiento y (cuando sea apropiado) en la prevención de una cualquiera de las siguientes enfermedades/trastornos;

La fibrosis quística, el síndrome de Liddles, la insuficiencia renal, la hipertensión, los desequilibrios de electrolitos.

En particular en algunas modalidades, los agentes ARNi se pueden utilizar para tratar y/o prevenir manifestaciones clínicas adversas de estas enfermedades/trastornos.

- 35 La invención además se ilustra por los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes.

EJEMPLOS

Fuente de reactivos

40 Cuando la fuente de un reactivo no se da específicamente en este documento, tal reactivo se puede obtener de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en un estándar de calidad/pureza para aplicación en biología molecular.

Ejemplo 1: Selección de secuencias

45 Con el fin de identificar los ARNsi(s) terapéuticos para reducir-modular la expresión de la subunidad alfa del canal de sodio epitelial ENaC (α -ENaC), conjuntos de detección fueron definidos basándose en un análisis bioinformático. Los controladores clave para el diseño del conjunto de detección fueron especificidad pronosticada de los ARNsi(s) contra el transcriptoma de la especie pertinente. Para la identificación de ARNsi(s) de alfa-ENaC y un sistema de administración eficiente se utilizó un enfoque de tres vertientes: Se seleccionó la rata como la especie de prueba para abordar la eficacia de silenciamiento *in vivo* después de la administración intratraqueal, el conejillo de indias fue seleccionado como el organismo modelo de la enfermedad para demostrar que la reducción de ARNm de alfa-ENaC da lugar a un efecto funcional medible. La molécula de ARNsi terapéutica tiene que dirigir alfa-ENaC humano así

50 como la secuencia de alfa-ENaC de al menos una especie pertinente toxicológicamente, en este caso, el mono rhesus.

5 Los análisis iniciales de la secuencia de ARNm de alfa-ENaC pertinente, revelaron que pocas secuencias se pueden identificar que cumplen a cabalidad los requisitos de especificidad y al mismo tiempo dirigen el ARNm de alfa-ENaC en todas las especies pertinentes. Por lo tanto se decidió diseñar conjuntos de detección independientes para el ARNsi terapéutico y para las moléculas sustituto que se prueban en el modelo de la enfermedad pertinente (Tablas 1A, 1B, 1C y 1D).

Todos los ARNsi(s) reconocen la secuencia de alfa-ENaC humano, como un sistema de cultivo de células humanas fue seleccionado para la determinación de actividad *in vitro* (H441, ver más abajo). Por lo tanto todos los ARNsi(s) se pueden utilizar para dirigir ARNm de alfa-ENaC humano en un entorno terapéutico.

10 Los conjuntos de detección terapéuticos fueron diseñados para contener solo secuencias de ARNsi que sean completamente complementarias a las secuencias de alfa-ENaC humano y mono rhesus.

Diseño y selección *in silico* de ARNsi(s) dirigido a alfa-ENaC (SCNNIA)

El diseño de ARNsi se llevó a cabo para identificar los ARNsi(s) para los cuatro conjuntos definidos previamente (ver arriba)

- a) "Conjunto de detección inicial"
- 15 b) "Conjunto de detección ampliado"
- c) "Conjunto sustituto *in vivo* para rata"
- d) "Conjunto sustituto *in vivo* para conejillo de indias"

Conjunto de detección inicial

20 El objetivo para la selección *in silico* de un conjunto de detección inicial fue identificar los ARNsi(s) dirigidos específicamente a alfa-ENaC humano, así como su ortólogo de mono rhesus. El ARNm diana humano (NM_001038.4) fue descargado de la fuente NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) durante el procedimiento de selección de ARNsi completo. Con el fin de identificar el alfa-ENaC del ortólogo de rhesus (*Macaca mulatta*), la secuencia humana se utilizó en una búsqueda blastn en Baylor College of Medicine
25 (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Mmulatta>) contra Mmulatta contigs como de 2004 10 01. Todas las regiones acertadas fueron extraídas y ensambladas por la herramienta de montaje CAP para generar una primera secuencia de montaje. Además, una búsqueda BLAST se realizó con la secuencia humana en UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Rhesus&db=rheMac2&hgsid=84859356>) contra Rhesus freeze 12 March 2005. El armazón proteínico acertado 84554 fue descargado y utilizado junto con la primera
30 secuencia de montaje, mediante CAP para generar la secuencia consenso final para alfa-ENaC rhesus.

La siguiente extracción de todas las secuencias 19mer solapantes fuera del ARNm humano, fue identificado que 19mers conservados tuvieron secuencias idénticas en la secuencia consenso rhesus ensamblada. Las secuencias de 19mer fueron definidas como el grupo de secuencias (sentido) de ARNsi de humano-rhesus con reactividad cruzada, representada por 1185 19mers.

35 Las secuencias antisentido correspondientes fueron generadas y probadas para especificidad en humano. Para esto, su potencial pronosticado para interactuar con ARNm(s) diana irrelevante (potencial inespecífico) se tomó como parámetro. Las secuencias con bajo potencial inespecífico fueron definidas como preferibles y pronosticadas para ser más específicas.

40 Para una selección adicional, los candidatos de ARNsi(s) fueron clasificados de acuerdo con su potencial pronosticado para interactuar con otras secuencias huésped (en este documento, sin limitación, humanas). Se asume que los ARNsi(s) con potencial inespecífico bajo son más específicos *in vivo*. Para la predicción del potencial inespecífico, específico de ARNsi, se hicieron los siguientes supuestos:

- 1) potencial inespecífico de una cadena se puede deducir del número y distribución de apareamientos erróneos con un inespecífico
- 45 2) el inespecífico más pertinente, que es el gen pronosticado para tener la probabilidad más alta de ser silenciado debido a la tolerancia de apareamientos erróneos, determina el potencial inespecífico de la cadena

3) posiciones 2 a 9 (contando de 5' a 3') de una cadena (región de siembra) pueden contribuir más al potencial inespecífico que el resto de la secuencia (es decir sitio de región de escisión que no-siembra) (Haley, B., and Zamore, P.D., Nat Struct Mol Biol. 2004, 11:599).

5 4) posiciones 10 y 11 (contando de 5' a 3') de una cadena (sitio de región de escisión) puede contribuir más al potencial inespecífico que la región no-siembra (es decir las posiciones 12 a 18, contando de 5' a 3')

5) posiciones 1 y 19 de cada cadena no son pertinentes para las interacciones inespecíficas

6) potencial inespecífico se puede expresar por la puntuación inespecífica del inespecífico más pertinente, calculado con base en el número y posición de apareamientos erróneos de la cadena para la región más homóloga en el gen inespecífico teniendo en cuenta los supuestos 3 a 5

10 7) asumiendo el potencial fracaso de actividad de la cadena codificante mediante las modificaciones internas introducidas, solo el potencial inespecífico de la cadena no codificante será pertinente

Para identificar los genes inespecíficos potenciales, las secuencias antisentido 19mer fueron sometidas a una búsqueda de homología contra las secuencias de ARNm humano disponibles públicamente, asumidas para representar el transcriptoma integral humano.

15 Para este propósito, la búsquedas fastA (versión 3.4) se llevó a cabo con todas las secuencias 19mer contra una base de datos RefSeq humana (versión disponible de ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/ on Nov., 18 2005). La búsqueda FastA se ejecutó con parámetros de valores de pares -f 30 -g 30 con el fin de tener en cuenta la homología sobre la longitud completa de la 19mer sin huecos. Además, con el fin de asegurar la lista de todos los aciertos inespecíficos pertinentes en el archivo de salida de fasta, se utilizó el parámetro -E 15000.

20 La búsqueda dio como resultado una lista de inespecíficos potenciales para cada secuencia de entrada enumerada por homología de secuencia descendente sobre la 19mer completa.

Para clasificar todos los inespecíficos potenciales de acuerdo con los supuestos 3 a 5, y con esto identificar el gen inespecífico más pertinente y su puntuación inespecífica, los archivos de salida fastA fueron analizados mediante un guión perl.

25 El guión extrajo las siguientes propiedades inespecíficas para cada secuencia de entrada 19mer y cada gen inespecífico para calcular la puntuación inespecífica:

Número de apareamientos erróneos en región no-siembra

Número de apareamientos erróneos en región siembra

Número de apareamientos erróneos en región de sitio de escisión

30 La puntuación inespecífica se calculó teniendo en cuenta los supuestos 3 a 5 de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 \text{Puntuación inespecífica} &= \text{número de apareamientos erróneos siembra} * 10 \\
 &+ \text{número de apareamientos erróneos de sitio de escisión} * 1.2 \\
 &+ \text{número de apareamientos erróneos no-siembra} * 1
 \end{aligned}$$

35 El gen inespecífico más pertinente para cada secuencia 19 mer fue definido como el gen con la puntuación inespecífica más baja. Por consiguiente, la puntuación inespecífica más baja fue definida como representante del potencial inespecífico de cada ARNsi, representado por la secuencia antisentido 19mer analizada.

40 El potencial inespecífico calculado se utilizó como parámetro de clasificación (descendente por la puntuación inespecífica) con el fin de generar una clasificación para todas las secuencias de ARNsi con reactividad cruzada humano-rhesus.

Una puntuación inespecífica de 3 o más fue definida como requisito previo para la selección de ARNsi, mientras que todas las secuencias que contienen 4 o más G's en una fila (secuencias poli-G) fueron excluidas, lo que lleva a la selección de un total de 152 ARNsi(s) dirigidos a alfa ENaC humano y rhesus (ver Tabla 1a).

Conjunto de detección ampliado

El objetivo para la selección *in silico* del conjunto de detección extendido fue identificar todos los otros ARNsi(s) dirigidos a alfa-ENaC humano con suficiente especificidad, que fueron excluidos del conjunto inicial debido a la falta de reactividad cruzada con rhesus. Las secuencias restantes del grupo de 19mers derivado de alfa-ENaC humano que no han sido analizadas antes de se tomaran y las secuencias antisentido correspondientes fueron generadas. El gen inespecífico más pertinente y sus correspondientes puntuaciones inespecíficas se calcularon como se describe en la sección "conjunto de detección inicial".

Para determinar la reactividad cruzada para ratón y conejillo de indias (*Cavia porcellus/cobya*), las secuencias de alfa-ENaCs de estas especies fueron descargadas de la base de datos de nucleótidos¹ NCBI (números de acceso NM_011324.1 y AF071230 (longitud completa)/DQ109811 (cds parcial), respectivamente). Las dos secuencias de conejillo de indias fueron utilizadas para generar una secuencia consenso de alfa-ENaC de conejillo de indias. Toda la secuencia 19mer humana se probó para determinar la presencia en las secuencias de ratón y conejillo de indias. Las secuencias positivas fueron asignadas al grupo de secuencias (sentido) de ARNsi con reactividad cruzada humano-ratón, o secuencias (sentido) de ARNsi con reactividad cruzada humano-conejillo de indias. Después de la exclusión de todas las secuencias poli-G, las secuencias fueron seleccionadas con puntuaciones inespecífico de 3 o más así como aquellas con puntuaciones inespecíficas de 2.2 o 2.4 y reactividad cruzada con ratón, rhesus o conejillo de indias. El número total de ARNsi(s) en el grupo de detección ampliado fue 344 (ver Tabla 1b).

Conjunto sustituto de rata *in vivo*

El objetivo para la selección *in silico* del conjunto sustituto de rata *in vivo* fue identificar todos los ARNsi(s) dirigidos a alfa-ENaC humano y rata con suficiente especificidad en rata. Para la identificación de ARNsi(s) con reactividad cruzada humano-rata, secuencia de ARNm de alfa-ENaC de rata fue descargada de la base de datos de nucleótidos NCBI (número de acceso, NM_031548.2), y todas las secuencias fuera del grupo de 19mers humanas fueron probadas para determinar la presencia en la secuencia de rata, que representa el grupo de secuencias (sentido) de ARNsi con reactividad cruzada humana-rata.

Las secuencias antisentido correspondientes fueron generadas y probadas para determinar la especificidad en rata. Para esto, el gen inespecífico más pertinente en rata y sus correspondientes puntuaciones inespecíficas se calcularon como se describe en la sección "conjunto de detección inicial" utilizando el conjunto de ARNm de rata (base de datos RefSeq) en lugar de los transcritos humanos. Después de la exclusión de todas las secuencias poli G, se generó una clasificación teniendo en cuenta la puntuación inespecífica de rata en primera prioridad y la puntuación inespecífica de humano con segunda prioridad. Las 48 secuencias de la parte superior de la lista finalmente se seleccionaron, que representan el conjunto sustituto de rata *in vivo* (ver Tabla 1c).

Conjunto sustituto de conejillo de indias *in vivo*

El objetivo para la selección *in silico* del conjunto sustituto de conejillo de indias *in vivo* fue identificar todos los ARNsi(s) dirigidos a alfa-ENaC humano y conejillo de indias que no han sido seleccionados en los conjuntos previos. Los ARNsi(s) restantes del conjunto de secuencias (sentido) de ARNsi con reactividad cruzada humano-conejillo de indias determinado previamente fueron clasificados de acuerdo con puntuaciones inespecíficas humanas. Las mejores 63 secuencias (excluyendo las secuencias poli-G) fueron seleccionadas, representando el conjunto sustituto de conejillo de indias *in vivo* (ver Tabla 1d).

Ejemplo 2: síntesis de ARNsiSíntesis de nucleótidos que comprenden bases naturales

A medida que los ARNsi(s) de los conjuntos de detección son todos potencialmente destinados a la administración *in vivo*, los ARNsi(s) se sintetizaron con una estrategia de modificación que protege los ARNsi(s) de la degradación por endo- y exonucleasas en un entorno biológico. En esta estrategia, los extremos-3' de ambas cadenas se protegen de una actividad 3'→5' exonucleolítica por un enlace fosforotioato entre las dos últimas nucleobases en el extremo 3'. Con el fin de inhibir la degradación endo-nucleolítica del ARNsi, todas las pirimidinas en la cadena codificante del ARNsi fueron reemplazadas con el ribonucleótido 2'-O-metilo-modificado correspondiente. Para reducir el número de modificaciones en la cadena no codificante, que es la cadena más activa y por lo tanto más sensible a las modificaciones, solo modificamos las pirimidinas en el contexto de principales sitios de escisión de la nucleasa identificados previamente con grupos 2'-O-metilo. Los principales sitios de escisión son los siguientes dos motivos secuenciales: 5'-UA-3' y 5'-CA-3'.

Dado que también se ha considerado utilizar ARNsi(s) en formulaciones que potencialmente protegen los ARNs del entorno biológico nucleolítico en el pulmón, el mismo conjunto de ARNsi(s) también fue sintetizado sin ninguna protección de la degradación endonucleolítica.

Cuando la fuente de un reactivo no se da específicamente en este documento, dicho reactivo puede ser obtenido de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en un estándar de calidad/pureza para aplicación en biología molecular.

- 5 Los ARNs monocatenarios fueron producidos mediante síntesis de fase sólida en una escala de 1 mmol utilizando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Germany) y como soporte sólido, vidrio de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany). Se generaron, por síntesis de fase sólida el ARN y el ARN que contiene nucleótidos 2'-O-metilo, empleando las correspondientes fosforamiditas y 2'-O-metilo fosforamiditas, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany). Estas unidades estructurales fueron incorporadas en los sitios seleccionados entre la secuencia de la cadena oligoribonucleótido utilizando química estándar de nucleósido fosforamidita, tal como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Los ligamientos fosforotioato fueron introducidos, mediante el reemplazo de la solución oxidante de yodo con una solución del reactivo Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, UK) en acetonitrilo (1%). Otros reactivos auxiliares fueron obtenidos de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Germany).
- 10
- 15 La desprotección y purificación de los oligoribonucleótidos crudos por HPLC de intercambio aniónico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos. Los rendimientos y concentraciones se determinaron por absorción UV de una solución del respectivo ARN a una longitud de onda de 260 nm utilizando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Germany). El ARN de doble cadena se generó, mediante la mezcla de una solución equimolar de cadenas complementarias en solución reguladora de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua entre 85 - 90°C, durante 3 minutos y se enfrió a temperatura ambiente, durante un periodo de 3 - 4 horas. La solución de ARN hibridada se diluyó a una concentración de ARN de doble cadena 50 mmol/L y se almacenó a -20 °C hasta su uso.
- 20

Ejemplo 3: Prueba de ARNs *in vitro*

- 25 La capacidad de los agentes ARNi para inhibir la expresión de alfa-ENaC se probó en líneas celulares humanas *in vitro*, o en ratas *in vivo*. El agente ARNi se transfecta en la células, por ejemplo, por transfección, se deja actuar en las células durante un tiempo determinado, por ejemplo, 24 horas, y los niveles de ARNm de alfa-ENaC se determinaron por análisis de ADN ramificados. Alternativamente, el agente ARNi se administra *in vivo* a través de la ruta intratraqueal y la inhibición de expresión de ARNm de alfa-ENaC determinada por el análisis de ADN ramificado en el órgano diana. Como complemento de estos ensayos directos, se probaron para determinar la inhibición de expresión del gen diana por agentes ARNi para ARNm de alfa-ENaC expresado recombinantemente en células huésped de mamífero.
- 30

Líneas celulares

- 35 Las células H441 fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC-Número: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Germany) y fueron cultivadas en RPMI 1640, suero fetal bovino al 10%, 100u de penicilina / 100 µg/mL de estreptomycin, glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y Piruvato de sodio 1 mM (todos de Biochrom AG, Berlin, Germany) a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

- 40 Los primarios de células epiteliales bronquiales humanas fueron obtenidos de Cambrex (Cat # CC-2540) y fueron cultivados de forma rutinaria en medio BEGM con singlequots (Cambrex Cat # CC-3170 menos tri-iodotreonina). Para la polarización y cultivo en la interfase aire líquido la células fueron cultivadas en una mezcla 1:1 de BEGM:DMEM suplementado con 4.5 g/L de D-Glucosa (Gibco BRL Cat # 41965-039) y suplementado con singlequots (Cambrex Cat # CC-4175), como el anterior pero menos la tri-iodotreonina y alícuotas de GA1000 y en la presencia de 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco Brl Cat # 10131-015). Como las células se mantuvieron en medio libre de suero, durante las etapas de pases en el medio de cultivo, se utilizó una solución de neutralización de tripsina (Cambrex Cat # CC-5002). Para la polarización y el cultivo en la interfase aire-líquido la células se cultivaron en soportes de policarbonato semipermeables (0.4 micras) (Coming Costar Cat # 3407 #3460) y se cultivaron siempre a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.
- 45

Las células de riñón de mono verde Africano Cos-1 (ATCC # CRL-1650) fueron cultivadas en MEM de Dulbecco, 4.5 g/L de glucosa, suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mM, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio (Gibco BRL), 100u de penicilina /100 µg/mL de estreptomycin.

50 **Ejemplo 3.1: Detección *in vitro* de ARNs(s) de alfa-ENaC activos y determinación de IC₅₀ en H441**

Un día antes de la transfección, la expresión de ENaC-alfa fue inducida en las células H441 (ATCC-Número: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Germany), mediante la adición de 100 nM de dexametasona. Directamente antes de la transfección, las células se sembraron a 1.5×10^4 células/pozo en placas de 96-pozos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) en 75 µL de medio de cultivo (RPMI 1640, suero fetal bovino al 10%, 100u de

penicilina / 100 µg/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y Piruvato de sodio 1 mM, todos de Biochrom AG, Berlin, Germany). Las transfecciones se llevaron a cabo por cuadruplicado. Para cada pozo 0.5 µL de Lipofectamine2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) se mezclaron con 12 µL de Opti-MEM (Invitrogen) y se incubaron, durante 15 min a temperatura ambiente. Siendo la concentración de ARNsi 50 nM en el volumen de transfección de 100 µL, se mezcló 1 µL de un ARNsi 5 mM con 11.5 µL de Opti-MEM por pozo, se combinaron con la mezcla Lipofectamine2000-Opti-MEM y se incubaron otra vez, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se aplicaron completamente los complejos-siRNALipofectamine2000 (25 µL cada uno por pozo) a las células y las células se incubaron, durante 24 h a 37°C y 5 % de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau).

Las células se recogieron, mediante la aplicación de 50 µL de mezcla de lisis (contenido del QuantiGene bDNA-kit de Genospectra, Fremont, USA) a cada pozo que contiene 100 µL de medio de cultivo y se lisaron a 53°C, durante 30 min. Posteriormente, se incubaron 50 µL de los lisados con conjuntos de sondas específicos para ENaC-alfa humano y GAPDH humano (ver a continuación la secuencia de conjuntos de sondas) y se procedió de acuerdo con el protocolo del fabricante para QuantiGene. Se midió la quimioluminiscencia en el extremo en un Victor2-Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) como RLUs (unidades relativas de luz) y los valores obtenidos con el conjunto de sondas hENaC fueron normalizados para los valores de GAPDH respectivos para cada pozo. Los valores obtenidos con ARNsi(s) dirigidos contra ENaC-alfa fueron relacionados con el valor obtenido con un ARNsi no específico (dirigido contra HCV) que se establece en 100%. El porcentaje residual de la expresión de alfa-ENaC para los ejemplos de ARNsi, se muestra en las Tablas 1A-1D.

Los ARNsi(s) efectivos a partir de la detección se caracterizaron además por curvas de dosis respuesta. Las transfecciones de curvas de dosis respuesta se llevaron a cabo en 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 (no ARNsi) y se diluyeron con Opti-MEM a una concentración final de 12.5 µl de acuerdo con el protocolo anterior. El análisis de los datos se realizó utilizando Microsoft Excel add-in software XL-fit 4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, UK) y aplicando el modelo sigmoidal número 606.

Conjuntos de sondas:

alfa-ENaC humano:

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hENAC001	.235.255.CE	CE	gtctgtccagggttctctccTTTTctcttggaagaaagt	1645
hENAC002	.274.293.CE	CE	actgccattctgtgtagtTTTTctcttggaagaaagt	1646
hENAC003	.344.367.CE	CE	ctctctggaagcaggagtgaataTTTTctcttggaagaaagt	1647
hENAC004	.391.411.CE	CE	gccgcgatagaagatgtaggTTTTctcttggaagaaagt	1648
hENAC005	.501.521.CE	CE	gcactgtggaacagcccagTTTTctcttggaagaaagt	1649
hENAC006	.539.560.CE	CE	agcagagagctgtagctggtcTTTTctcttggaagaaagt	1650
hENAC007	.256.273.LE	LE	cgccataatcgccccaaTTTTtaggcataggaccctgtct	1651
hENAC008	.368.390.LE	LE	cacagccactcctgatcatgTTTTtaggcataggaccctgtct	1652
hENAC009	.412.431.LE	LE	acagtactccactgtctggTTTTtaggcataggaccctgtct	1653
hENAC010	.455.477.LE	LE	ggagcttatagtagcagtaccccTTTTtaggcataggaccctgtct	1654
hENAC011	.522.538.LE	LE	acgctgcatggcttccgTTTTtaggcataggaccctgtct	1655
hENAC012	.561.580.LE	LE	gaggccatcgtgagtaaccTTTTtaggcataggaccctgtct	1656
hENAC013	.214.234.BL	BL	Tcatgctgatggaggtctcca	1657

(continuación)

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hENAC014	.294.318.BL	BL	Ggtaaagggttctcaacaggaacatc	1658
hENAC015	.319.343.BL	BL	Cacacctgctgtgtgactttgaag	1659
hENAC016	.432.454.BL	BL	Caggaactgtgctttctgtagtc	1660
hENAC017	.478.500.BL	BL	Gtggctgaggagaagtcaacct	1661
hENAC018	.581.599.BL	BL	Ccattcctgggatgtcacc	1662

GAPDH humano:

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hGAP001	AF261085.252.271.CE	CE	gaattgccatgggtggaatTTTTctcttgaaagaaagt	1663
hGAP002	AF261085.333.352.CE	CE	ggagggatctcgctcctggaTTTTctcttgaaagaaagt	1664
hGAP003	AF261085.413.431.CE	CE	cccagccttccatggtTTTTctcttgaaagaaagt	1665
hGAP004	AF261085.432.450.CE	CE	gctccccctgcaaagagTTTTctcttgaaagaaagt	1666
hGAP005	AF261085.272.289.LE	LE	agccttgacgggtccatgTTTTtagcataggaccctgtct	1667
hGAP006	AF261085.290.310.LE	LE	gatgacaagctcccgttctTTTTtagcataggaccctgtct	1668
hGAP007	AF261085.311.332.LE	LE	agatggatgaggattccattTTTTtagcataggaccctgtct	1669
hGAP008	AF261085.353.372.LE	LE	gcatgccccacttgattTTTTtagcataggaccctgtct	1670
hGAP009	AF261085.373.391.LE	LE	cacgacgtactcagcgccaTTTTtagcataggaccctgtct	1671
hGAP010	AF261085.451.472.LE	LE	ggcagagatgatgacctttgTTTTtagcataggaccctgtct	1672
hGAP011	AF261085.392.412.BL	BL	Ggtgaagacgccagtggactc	1673

Las IC₅₀s para los ejemplos de ARNsi se muestran en las Tabla 2A y 2B.

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

5 Las células epiteliales bronquiales humanas (referencia donante 4F1499) se sembraron en placas de 24-pozos a 1x10⁵ células por pozo en 0.5 mL de medio de cultivo un día antes de la transfección. Las células eran 70% confluentes en el día de la transfección del ARNsi.

10 Cada ARNsi se volvió a suspender a 100nM en 1mL de Optimem I (Invitrogen) y en un tubo separado, se diluyó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a 6 µL/mL en Optimem, proporcionando una cantidad suficiente para la transfección de cuatro repeticiones en una placa de 24 pozos. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, las mezclas se combinaron para dar la concentración final deseada de ARNsi 50nM y 3 µL/mL de Lipofectamine 2000. La mezcla de transfección se incubó, durante otros 20 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 420 µL del complejo ARNsi/reactivo a cada pozo según se estipula por el diseño experimental. Las placas se sacudieron suavemente para asegurar la mezcla completa y a continuación se incubaron a 37°C en un incubador a 5% de CO₂/95% de aire por 4 horas. Posteriormente, la mezcla de transfección se aspiró y las células se regresaron a las condiciones de cultivo normales por otras 20 horas.

15 Los lisados celulares se prepararon para el análisis de ADN ramificado. Se preparó una mezcla 2:1 de medio:solución reguladora de lisis (Panomics) y las células fueron lisadas en 200 µL a 53°C, durante 30 minutos. Después de una comprobación visual de lisis completa, los lisados celulares se almacenaron a -80 °C, para su análisis posterior. El análisis de ADN ramificado se realizó como se describe anteriormente, con la expresión de alfa-

ENaC normalizada contra GAPDH. El protocolo de análisis de ADN ramificado utilizado difiere del anterior solamente en que 20 μ L de la muestra se aplicaron a cada pozo, en este caso.

La Tabla 2C muestra la expresión de alfa-ENaC en HBEC primario para los ejemplos de ARNsi.

Ejemplo 3.3: Inhibición *in vitro* de la expresión del gen alfa-ENaC expresado exógenamente de cinomólogo clonado por agentes seleccionados de ARNi en células Cos-1

Clonación de la secuencia de alfa-ENaC de cinomólogo

Secuencias del cebador para la amplificación de 5'- UTR y CDS (nucleótidos mostrados en corchetes corresponden al *Macaca mulatta* (mono Rhesus) secuencia de ADNc α -ENaC):

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

10 P733: 5'- CCGGCCGCGGGCGGGCT-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 del cebador para la amplificación de CDS y 3'- UTR:

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

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

Secuencias del cebador para la amplificación de 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)

20 ARN total de pulmón de cinomólogo (*Macaca fascicularis*) (#R1534152-Cy-BC) se adquirió de BioCat (Germany). La síntesis de ADNc se realizó utilizando el SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen). La síntesis de ADNc se realizó utilizando ya sea hexámeros aleatorios o cebadores oligo dT. Además, ADNc de la primera cadena de pulmón de cinomólogo también se adquirió de BioCat (#C1534160-Cy-BC). Para la amplificación por PCR, se utilizó el Advantage 2 PCR kit (# K1910-1, Clontech). La amplificación del 5'-UTR y partes del CDS se realizó utilizando P745 y una mezcla equimolar de P733, P734 y P735. Para la amplificación por PCR del CDS y 3'-UTR, fueron utilizados los cebadores P737 y P740. Los cebadores P713 y P715 fueron utilizados para la amplificación de partes de los CDS.

30 Todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa y a continuación se clonaron en el vector pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) en bacteria TOP10. Los clones luego se recogieron y el ADN se aisló utilizando el kit Qiagen Miniprep. Después de la digestión con enzima de restricción con *EcoRI* y análisis por electroforesis de gel de agarosa, el ADN de clones correctos fueron sometidos a secuenciación.

35 Las secuencias luego fueron alineadas con la secuencia de ADNc de α -ENaC de mono Rhesus, y las secuencias de los clones individuales fueron alineadas entre sí. A continuación, el ADNc de alfa-ENaC cinomólogo de longitud completa fue clonado por digestión de la 5'-parte (5'-UTR y CDS, clon 55) con *EcoR I* y *Not I*, digestión de la parte media del CDS por *Not I* y *BstE II* (clon 15), y la 3'- parte (CDS y 3'- UTR) por *BstE II* y *EcoR V* (clon 80). Los fragmentos de ADN digeridos luego fueron subclonados en pcDNA3.1, digeridos con *EcoR I* y *EcoR V*. El ADNc de alfa-ENaC cinomólogo de longitud completa en pcDNA3.1 luego se sometieron a secuenciación de longitud completa (Ingenetix, Vienna, Austria). La secuencia de ADNc de alfa ENaC cinomólogo corresponde a nt 28-3113 de la secuencia de ADNc de alfa-ENaC Rhesus. Por último el ADNc de alfa-ENaC cinomólogo luego se cortó de alfa-ENaC pcDNA3.1-cinomólogo por digestión con *BamH I* y *EcoR V* y se subclonó en el vector pXOON. El mapa del plásmido se ilustra en la Figura 1. La Figura 2 representa la secuencia de la proteína (SEQ.I.D.NO:1681) y del ADN (SEQ.I.D.NO:1682) de alfa-ENaC de cinomólogo.

Transfecciones:

Las células COS-1 se sembraron en 6×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos cada una en 0.5 mL de medio de cultivo. Un día después de la siembra las células se co-transfectaron con el plásmido de expresión de alfa-ENaC

cinomólogo pXOON y el ARNsi indicado. Para cada pozo, 4ng de plásmido de expresión de alfa-ENaC y 600ng de plásmido portador (pNFAT-luc) fueron co-transfectados con el ARNsi pertinente (concentración final 45nM) utilizando reactivo de transfección del gen X-treme (Roche) a 3.75 µL/pozo en un volumen total de 720 pL/pozo de Opti-MEM (Invitrogen) como se describe a continuación.

- 5 Las transfecciones se llevaron a cabo por triplicado para cada muestra. Mezclas maestras de plásmido/ARNsi (cada una para 3.5 pozos) se prepararon de la siguiente manera: 14 ng del plásmido de expresión de alfa-ENaC, 2.1 mg de plásmido portador y 112 pmoles de ARNsi pertinente en un volumen total de 210 µL (Opti-MEM). Una mezcla maestra de lípido se preparó para la transfección completa (105 µL de lípido más 1575 µL de Opti-MEM para ocho muestras de transfección por triplicado). El plásmido/ARNsi y lípido se mezclaron en un volumen igual para dar un volumen total de 420 µL de mezcla de transfección por triplicado de muestra (3.5x). Después de una incubación por 10 20 minutos a temperatura ambiente, 120 µL de la mezcla de transfección pertinente se adicionaron a cada pozo de células en un volumen final de transfección de 720 µL (Opti-MEM). Las células fueron transfectadas durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau, Germany) y se recogieron para el análisis de ADN ramificado.
- 15 Los lisados celulares se prepararon para el análisis de ADN ramificado. Se preparó una mezcla 2:1 de medio:solución reguladora de lisis (Panomics) y las células fueron lisadas en 200 µL a 53°C, durante 30 minutos. Después de una comprobación visual de la lisis completa, los lisados celulares se almacenaron a -80 °C, para su análisis posterior. El análisis de ADN ramificado se realizó como se describe anteriormente, con expresión de alfa-ENaC cyno normalizado contra eGFP del plásmido de expresión. El protocolo del análisis de ADN ramificado 20 utilizado difiere del anterior solamente en que 20 µL de muestra se aplicaron a cada pozo, en este caso.

Conjuntos de sondas:

alfa-ENaC de cinomólogo:

Nombre FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
cyENa001	CE	cgccgtgggctgctgggTTTTctcttggaaagaaagt	1683
cyENa002	CE	ggtaggagcggggaactcTTTTctcttggaaagaaagt	1684
cyENa003	CE	cagaagaactcgaagagctctcTTTTctcttggaaagaaagt	1685
cyENa004	CE	cccagaaggccgtcttcatTTTTctcttggaaagaaagt	1686
cyENa005	LE	ggtgcagagccagagcactgTTTTctcttggaaagaaagt	1687
cyENa006	LE	gtgccgcaggttctgggTTTTaggcataggaccctgtct	1688
cyENa007	LE	gatcagggcctcctcctcTTTTaggcataggaccctgtct	1689
cyENa008	LE	ccgtgatggtgtattgtgTTTTaggcataggaccctgtct	1690
cyENa009	LE	gcggtgtgctgggagcTTTTaggcataggaccctgtct	1691
cyENa0010	LE	ttgccagtacatcatgcaaaaTTTTaggcataggaccctgtct	1692
cyENa0011	BL	acaccaggcggatggcg	1693

eGFP:

Nombre FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
EGFP001	CE	ggcacgggcagcttcTTTTctcttggaaagaaagt	1694
EGFP002	CE	ggtagcggctgaagcactgTTTTctcttggaaagaaagt	1695

Medición del interferon- α : Las células en el cultivo se combinaron con ya sea oligonucleótido 500 nM (o μ M) en Optimem o oligonucleótido 133 nM en GP2 o Lipofectamine2000 o agente de transfección DOTAP por 24 horas a 37°C. El interferon- α se midió con Bender Med Systems (Viena, Austria) instant ELISA kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Selección de secuencias terapéuticas líder se basó en un nivel de inducción del IFN α de menos del 15% del control positivo.

Ejemplo 3.5 Determinación de estabilidad de ARNsi en esputo de pacientes con CF

10 Las muestras de esputo se recolectaron por el Dr. Ahmet Uluer, Children's Hospital Boston. Después de la recolección, las muestras de esputo fueron tratadas con antibiótico y fueron irradiadas con UV para reducir el contenido bacteriano. Para determinar la estabilidad de ARNsi en muestras de esputo, los ARNsi(s) se incubaron en 30 μ L de esputo a una concentración de 5 μ M a 37°C, durante los tiempos indicados. La reacción se terminó por la adición de proteinasa K y las muestras se incubaron a 42°C, durante otros 20 minutos. Se adicionó una molécula de ARN 40-mer fabricada de L-nucleótidos ("Spiegelmer") resistente a la degradación de la nucleasa y sirvió como estándar de calibración. Las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.2 mm para eliminar los residuos restantes. Las muestras fueron analizadas mediante HPLC de intercambio iónico desnaturante en una columna DNAPac PA 200 (Dionex) a pH 11.0, utilizando para la elución un gradiente de perclorato de sodio. Los ARNsi(s) y los productos de degradación fueron cuantificados mediante la determinación del área bajo el pico para cada muestra. La concentración se normalizó a la concentración en las muestras sin incubarse.

20 La selección de las secuencias terapéuticas líder (ND8356, ND8357 y ND8396) se basó en una estabilidad *in vitro* observada en esputo de CF con una vida media mayor de 60 minutos.

Ejemplo 3.6 La verificación de secuencias terapéuticas líder contra polimorfismos conocidos en gen humano SCNN1A

25 Para excluir los conocidos polimorfismos de los sitios diana de candidatos líder, las secuencias de ARNsi líder se comprobaron contra el base de datos del polimorfismo de nucleótidos únicos (SNP) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp>). De los 10 polimorfismos de exón conocidos en el gen SCNN1A humano, se demostró que ninguno estaba presente en los sitios diana de cualquiera de los 10 más potentes candidatos terapéuticos líder.

Ejemplo 3.7: Perfiles *in vitro* de las 5 mejores secuencias inespecíficas pronosticadas

30 Una lista de las alineaciones para cada secuencia fue ordenada por homología sobre la región de 19-mer. Los inespecíficos fueron puntuados basándose en el número y posición de los apareamientos erróneos de acuerdo con los criterios descritos en el ejemplo 1. Las 5 mejores secuencias inespecíficas se identificaron para cada secuencia terapéutica líder (ND8356, ND8357 y ND8396). Las secuencias específicas e inespecíficas fueron individualmente clonadas en un sistema indicador de luciferasa doble. Cada fragmento clonado abarcó los 19 nucleótidos diana en adición a la región flanqueadora de 10 nucleótidos, ambos 5' y 3' de la secuencia diana. Los fragmentos fueron clonados en un sitio de clonación múltiple 3' para la secuencia de luciferasa de Renilla, bajo el control de un promotor de SV40. La actividad de cada ARNsi contra ambas secuencias específicas e inespecíficas se determinó por la fluorescencia relativa de la diana de luciferasa de Renilla a la luciferasa de luciérnaga, siendo la última controlada independientemente por el promotor HSV-TK. Inicialmente, las transfecciones se llevaron a cabo en células COS-7 a una concentración de ARNsi de 50nM. Las lecturas de luciferasa se tomaron a las 24h después de la transfección. A esta alta concentración de ARNsi, no se observó interferencia génica mayor del 30% contra cualquier secuencia inespecífico para cualquiera de los tres ARNsi(s) líderes. La actividad contra la secuencia específica se demostró con una reducción relativa en la actividad de luciferasa de Renilla de aproximadamente 80%. Las curvas de IC50 también fueron generadas para cada ARNsi contra la secuencia específica y controladas con las secuencias inespecíficas identificadas anteriormente. Para cada ARNsi líder, las IC50's específicas en este ensayo indicador fueron de similar orden de magnitud (10-50pM) a las IC50's obtenidas contra la diana endógena en H441 (Ejemplo 3.3) indicando que para ND8356, ND8357 y ND8396, la potencia contra la secuencia específica fue al menos 1000-5000 veces superior que para cualquiera de las secuencias inespecíficas pronosticadas.

Ejemplo 3.8: Perfiles de Genotoxicidad

50 1. Determinación de la citotoxicidad: La citotoxicidad se determinó utilizando un contador de células para la evaluación de número de célula de cultivo.

2. Es bien sabido que las pruebas de concentraciones de citotoxicidad *in vitro* puede inducir efectos genotóxicos tales como formación de micronúcleos. Por lo tanto, se considera que el aumento de números de células que contienen micronúcleos que aparecen en los recuentos de célula de alrededor de 50% o menos (en comparación

con el control negativo simultáneo) que se relacionan con la citotoxicidad si no hay aumento dependiente de la dosis en células micronucleadas podría ser ya observado en las concentraciones que muestran toxicidad moderada como mucho. El análisis de una concentración que muestra al menos 50% de reducción en recuento de células se requiere por las directrices regulantes de ensayos de células de mamífero *in vitro* (directrices de OECD e ICH para la conducción de ensayo de aberración del cromosoma). Además, los protocolos de OECD requieren pruebas de compuestos no tóxicos para incluir al menos una concentración de la precipitación (siempre que esta no exceda 10 mM o 5 mg/ml, cualquiera que sea menor). Dado que la prueba de micronucleos *in vitro* tiene por objeto predecir el resultado de los ensayos reguladores, i.e. ensayo de aberración cromosómica *in vitro*, el protocolo para la prueba de micronucleos *in vitro* fue diseñada para cumplir con los requisitos para estos ensayos.

3. Sistema de ensayo: las células TK6 son células inmortalizadas y transfectadas del Virus Epstein-Barr (origen linfoblastoide humano derivado del bazo). Determinación del potencial clastogénico y/o aneugénico en la prueba de micronucleos *in vitro* con células TK6 con/sin homogeneizado de S9-hígado (2%) a partir de ratas macho (Aroclor 1254-pretratado). El tiempo de tratamiento: 20 hr (-S9), 3 hr (+S9). Tiempo de muestreo: 24 hr después del inicio de 3-horas de tratamiento, 48 hr después del inicio de 20-horas de tratamiento. Para cada sustancia al menos tres concentraciones (2 cultivos por concentración) y 2000 células por concentración fueron analizadas.

4. El efecto de inducción de micronúcleos para una concentración probada fue considerado positivo si la frecuencia de células micronucleadas fue

- $\geq 2\%$ y mostró al menos el doble del valor del control de solvente simultáneo, OR

- $< 2\%$ y mostró al menos un aumento de 3-veces sobre el valor del control de solvente simultáneo

5. Para concluir que un experimento es positivo, se deben tener en cuenta la relación dosis-efecto y la citotoxicidad.

6.

7. Resumen: Las secuencias terapéuticas líder ND8396, ND8356, ND8357 no indujeron el número de células que contiene micronúcleos después de 20-horas de tratamiento sin activación metabólica, ni después de 3 horas de tratamiento con o sin S9. No pudo ser analizada la concentración citotóxica hasta el límite de prueba de 5 mg/ml.

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

Con el fin de demostrar la eficacia funcional *in vitro* de ARNsi líder contra alphaENaC, las células H441 se transfectaron con ARNsi y prepararon para el análisis de cámara de Ussings de transporte de iones. Para la transfección, las células H441 se sembraron en matraces T25 a 2×10^6 células por matraz en el medio de cultivo suplementado con Dexametasona 200nM. Las células en cada matraz se transfectaron con ya sea ND8396 o un ARNsi control no dirigido a ARNsi 30nM y 4mL/mL de Lipofectamine 2000 en un volumen total de 5mL (medio libre de suero). Un día después de la transfección, las células se sembraron sobre insertos Snapwell de 1 cm^2 a una confluencia (2×10^5 células por inserto) para minimizar el tiempo requerido para la diferenciación y formación de uniones estrechas y dotadas con medio en ambas la cámara apical y la basolateral. Después de un día adicional de cultivo el medio apical se eliminó y el medio basolateral se reemplazó, tomando así las células en el cultivo de interfase aire-líquido (ALI). Las células se mantuvieron en ALI por otros seis días antes del análisis de transporte de iones.

8. Para análisis funcional en las cámaras de Ussings, los insertos Snapwell se montaron en Cámaras de Difusión Vertical (Costar) y se bañaron con solución de Ringer gaseado continuamente (5% de CO_2 en O_2 ; pH 7.4) mantenido a 37°C que contiene: NaCl 120mM, NaHCO_3 25mM, KH_2PO_4 3.3mM, K_2HPO_4 0.8mM, CaCl_2 1.2mM, MgCl_2 1.2mM, y glucosa 10mM. La osmolaridad de la solución se determinó en el rango de 280 y 300 mosmol/kg de H_2O . Las células fueron fijadas con un voltaje de 0 mV (modelo EVC4000; WPI). La resistencia transepitelial (RT) se midió, mediante la aplicación de un impulso de 1 o 2-mV a intervalos de 30-s, o utilizando la diferencia potencial inicial a través de la células y la corriente inicial medida, y luego calculando RT por la ley de Ohm. Los datos fueron registrados utilizando una estación de trabajo PowerLab (ADInstruments). Después del tratamiento de ARNsi, se registraron las características basales de las células y la corriente cortocircuito sensible a la amilorida (ISC después de la aplicación de amilorida 10 mM; solo el lado apical). Se determinó la actividad del canal ENaC en cada cultivo por la ISC sensible a la amilorida en cada caso.

9. Después de un ensayo, las células en los insertos individuales se lisaron para el análisis de ARN. Una interferencia génica del 75% en el nivel ARN en el tiempo de ensayo (ND8396 en comparación con el control no dirigido) se recolectó con una interferencia génica funcional de la corriente sensible a la amilorida de aproximadamente 30% (ND8396 en comparación con el control no dirigido).

Las secuencias de ácido nucleico se representan a continuación, utilizando nomenclatura estándar, y específicamente las abreviaturas de la Tabla A.

Tabla A: Abreviaturas de monómeros de nucleótido utilizadas en representación de la secuencia de ácido nucleico. Será entendido que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos mutamente por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

5

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: ARNsi(s) seleccionados en el conjunto de detección inicial (ARNsi(s) con reactividad cruzada de ENaC humano-rhesus). Un total de 152 secuencias de ARNi se identificaron como un conjunto de detección inicial, tanto con (cadenas de secuencia 1-304) y sin (cadenas 305-608) modificación de esqueleto. Las secuencias de ARNi fueron diseñadas para ser completamente complementarias a ambas secuencias de alfa-ENaC monorhesus y humano, de acuerdo con el criterio de diseño descrito en la sección de los ejemplos. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección dosis-única independientes (consultar la sección de ejemplos para los métodos utilizados).

5

ID Dúplex	ID Seq	Sentido	Antisentido	Primera evaluación dosis única 50nM en H441; MV	Segunda evaluación 50nM en H441	SD	
ND8285	1	AGCCGUAAGCGUCCGCTT	2	GGAGGCCACGCUACGGCTT	92%	4%	15%
ND8286	3	CCGGUAUUGGUACAGGCTT	4	CCCGUGCACAUUACCGCTT	60%	1%	4%
ND8287	5	AUGCUAGCGGACAGAACTT	6	UGUUCUGCGGUAAGCAUPT	27%	2%	3%
ND8288	7	UGCUAUCGCGACAGAACTT	8	UUGUUCUGUGCGUAAGCAUPT	23%	1%	4%
ND8289	9	GCCGUAUUGGUACAGGCTT	10	GGAGCAUACAAACCGGCTT	64%	2%	8%
ND8290	11	CCCGUAUGGUGGCUCCCTT	12	UGAGGCGAUCGCUACCGCTT	83%	2%	5%
ND8291	13	CCGGAUUAAGAGGAGCTT	14	GCUCUCUUAUUUCCGCTT	54%	2%	10%
ND8292	15	CCGAAAGGUUCCGAAAGCTT	16	UCGSCUUCGAAACCUCCGCTT	40%	1%	8%
ND8293	17	GCAUUCGCGCUUUCCTT	18	GAAAAGCAGGCGCAUUGCTT	41%	2%	4%
ND8294	19	GGGAAUAACUCACUUCCTT	20	GAAGUGAGUAUUUCGCTT	19%	1%	5%
ND8295	21	GCGAAUAUCUUCUUCCTT	22	GGAGUGAGUAUUUCGCTT	19%	5%	1%
ND8296	23	AACAGGCGAAUUAUCUCCTT	24	GAGAGUAUUCGCUUGGCTT	92%	4%	19%
ND8297	25	GGUAUUGGUGCACGGCAGCTT	26	CUCCGUGCACCUUACCTT	79%	2%	14%
ND8298	27	CUACAGUGGCGCUUGGCTT	28	CACGAGGCGCAUCGUGGCTT	61%	3%	14%
ND8299	29	GUCCGAAAGGUUCCGAACTT	30	GUUCGGAACCUUCGAGCTT	16%	2%	3%
ND8300	31	GCGUAUCUGGUUCCAGGCTT	32	CCUGGAGACAGUAUCGCTT	50%	5%	5%
ND8301	33	CCGUAUCUGGUUCCAGGCTT	34	GCCUGGAGACAGUAUCGCTT	53%	2%	6%
ND8302	35	UGCUUUGGCGCAUUAUUCCTT	36	AAGUAUUGGUGCAACAGCAUPT	19%	1%	3%
ND8303	37	AACGGUUCUUCUUGGCTT	38	GCAUACGGGACAGCGUUCCTT	90%	3%	11%
ND8304	39	UUAAUUCGCGCUUGGCTT	40	ACCCAGGCGCAAGUUAUUCCTT	97%	3%	11%
ND8305	41	GCUUGUAUCUACAGUUGGCTT	42	GCAUUCGUGGUAUCAGCTT	73%	2%	7%

ND8306	43	uuAcucAcGauGGccuccgTst	44	CGAGGGCCAUCCGUGAGUAATst	91%	7%	93%	6%
ND8307	45	GAAGCCGAUACUGGUCUCCTst	46	GGAGACCAGUAUCCGCUUCTst	71%	3%	73%	6%
ND8308	47	GAUACUGGUCUCCAGGCCGst	48	CGCCUUGGAGACCAGUAUCTst	86%	1%	90%	9%
ND8309	49	AuAcuGGucuccAGGCCGATst	50	UCGGCCUGGAGACCAGUAUTst	71%	5%	70%	8%
ND8310	51	CAACGGUCUCUCCUAGUgTst	52	CAUCAGGACAGACCGUUGTst	80%	2%	84%	9%
ND8311	53	uuuAAcuuCGGGccuGGCGTst	54	CGCCAGGCCCAAGUuAAATst	95%	2%	107%	15%
ND8312	55	uAcuAcGAUGGGccucGGTst	56	CCGAGGGCCAUCCGUGAGUAst	44%	2%	97%	9%
ND8313	57	uuuCGGAGAGUAcuuAGCTst	58	GCUGAAGUACUCUCCEAAATst	14%	2%	16%	2%
ND8314	59	GcAGACGCUCUUUGACCUgTst	60	CAGGUCAAGAGCGUCUGCTst	55%	4%	58%	5%
ND8315	61	cuAcAuucuuAuuccCGCGTst	62	CCGGGAUACAAGAUgUgTst	20%	3%	26%	4%
ND8316	63	AGCGAAuuAcucucAcuuTst	64	AAGUGAGAGUAUUCCCUtst	24%	1%	25%	2%
ND8317	65	ccGcuuAcAaccAGGucucctst	66	GGAGACCUGGUUGAAGCGGst	62%	5%	64%	4%
ND8318	67	CAccGcAuGAAAGCGGCTst	68	GGCGUCUUCAUCCGGUUGTst	54%	6%	54%	4%
ND8319	69	AUGAAGACGGccuuuCGGgTst	70	CCcAGAAGCGCGUCUUCAUtst	44%	4%	44%	6%
ND8320	71	AGcAcAaccGcAuGAAgACTst	72	GUCUUCAUCCGGUUGGCUtst	15%	1%	16%	1%
ND8321	73	ucGAGuuccAccGuccuuATst	74	uAGGAGCGGUAGAACUCGATst	85%	5%	89%	13%
ND8322	75	cuGcuuCuAaccAGAcAuACTst	76	GuAUgUCUGGUAAGAGcACTst	46%	4%	44%	3%
ND8323	77	GAGGGAGUGGUAccGcuuctst	78	GAAGCGGUAcCAcUCCCUCTst	60%	7%	56%	3%
ND8324	79	ccuuuAuGGAuGUGGgTst	80	CcAcAUcAUCCAUAAAGGst	83%	9%	82%	1%
ND8325	81	UGAGGGAGUGGUAccGcuutst	82	AAGCGGUAcCAcUCCCUcATst	77%	6%	72%	2%
ND8326	83	ccuGcAAccAGGCGAAuuATst	84	UAUUUCCCGUUGGUAAGGst	41%	4%	44%	7%
ND8327	85	GGccuGGcGUGGAGAccuuctst	86	GAGGUCCcAGCcAGGCCtst	101%	5%	95%	4%
ND8328	87	UGCUUUUCCGGAGAGUAcuuTst	88	AAGUACUCCGAAAGcATst	36%	1%	29%	2%
ND8329	89	cccGUAAGGUGGccuccAGTst	90	CUGGAGGCCAGCvACGGGst	52%	1%	51%	2%
ND8330	91	CCGUAGCGUGGccuCCAGCTst	92	GCUGGAGGCCACCGUACGGst	86%	9%	84%	3%
ND8331	93	CCAGGGAAuuuAcuAcACTst	94	GUGAGAGUAUUCCGCUUGGst	15%	2%	13%	1%

ND8332	95	GAAAcuGcuAuAcuuucAAATsT	96	UUGAAAGuAuAGcAGUUCtTsT	10%	1%	10%	1%
ND8333	97	GcccGGGuAuGGuGcAcGtTsT	98	CGUGcAcAuUACCCGGGCTsT	83%	6%	82%	4%
ND8334	99	cccGGGuAuGGuGcAcGGtTsT	100	CCGUGcAcAuUACCCGGGTsT	56%	4%	71%	10%
ND8335	101	cGGGuAuGGuGcAcGGGcTsT	102	GCCCGUGcAcAuUACCCGGTsT	42%	3%	91%	8%
ND8336	103	GGGuAuGGuGcAcGGGcATsT	104	UGCCCGUGcAcAuUACCCtTsT	65%	5%	71%	7%
ND8337	105	uAuGGuGcAcGGGcAGGATsT	106	UCCUGCCCGUGcAcAuUATsT	46%	3%	46%	4%
ND8338	107	cUGGuuAcucAcGAugGccTsT	108	GGCcAuCGUGAGuAACcAGTsT	74%	5%	79%	10%
ND8339	109	GuuAcucAcGAugGccucTsT	110	GAGGGCCAuCGUGAGuAACTsT	85%	6%	92%	8%
ND8340	111	uGucAcGAugGucAcCCucTsT	112	GAGGGUGACcAuCGUGAcATsT	85%	4%	74%	5%
ND8341	113	uGcucGAGGuuCCGAAGTsT	114	CUUCGGNAcCUUCGGAGcATsT	37%	2%	32%	3%
ND8342	115	uccGAAGGuuCCGAAGccGtTsT	116	CGGUUCGGAAcCUUCGGATsT	60%	4%	47%	5%
ND8343	117	uuCCGAAGccGAuAcuGGuTsT	118	AcCAGuUcGGCUUCGGAAATsT	15%	1%	13%	2%
ND8344	119	AGccGauAcuGGuuccAGTsT	120	CUGGAGAcCAGuAUcGGcUTsT	49%	3%	41%	3%
ND8345	121	cuuGGuAcuGccucvGAATsT	122	GUUcAGAGGcAGuAcCANGTsT	55%	2%	47%	4%
ND8346	123	cuCCCGuAGcAcAcuAuAATsT	124	UuAuAGUGUGcUACGGGAGTsT	67%	3%	57%	5%
ND8347	125	uccCGuAGcAcAcuAuAATsT	126	GUuAuAGUGUGcUACGGGATsT	29%	1%	26%	3%
ND8348	127	uGcAcCuAuCuuuCuGATsT	128	uAcAAcAAuGUAUGGUGcATsT	17%	1%	15%	3%
ND8349	129	uuGcccGuuuAuGuAuGcuTsT	130	AGcAuAcAuAAAcGGGcAAATsT	68%	2%	50%	4%
ND8350	131	uGcccGuuuAuGuAuGcuTsT	132	GAGcAuAcAuAAAcGGGcATsT	59%	8%	44%	6%
ND8351	133	GGAcccuAGAccuGcAGTsT	134	CUGcAGAGGUcUAGGGUCCtTsT	86%	11%	82%	2%
ND8352	135	ccuAGAcccuGcAGccCATsT	136	UGGGcUGcAGAGGUcUAGGTsT	69%	7%	79%	3%
ND8353	137	uGGcAuGauGuAcuGGcAAATsT	138	UUUGCCAGuAcAuUcUGCCcATsT	58%	4%	52%	4%
ND8354	139	uAcuGGcAAuCCGGccuGcTsT	140	GcAGCCCGAAUUGCCcAGuATsT	101%	4%	100%	4%
ND8355	141	AAuuCGGccuGcuuuCCGGTsT	142	CCGAAuAGcAGCCCGAAUUTsT	49%	1%	43%	6%
ND8356	143	cuGcuuuuCCGGAGAGuAcuTsT	144	AGuAcUCUCcCGAAAGcAGTsT	17%	3%	18%	1%
ND8357	145	uuCCGGAGAGuAcuucAGcuTsT	146	AGCUGAAuGUAUCUCcCGAAATsT	13%	3%	16%	2%

ND8358	147	AgcAGAcGcucuuuGAcCuTsT	148	AGGUcAAAGAGCGUCUGCuTsT	73%	9%	71%	5%
ND8359	149	cuUGcAGCGccuGAGGGucTsT	150	GACCCUcAGCGCCUGcAAAGTsT	57%	9%	64%	7%
ND8360	151	uGGcuuuAAcuuGcGGccuTsT	152	AGGCCGcAAGUuAAAGCCATsT	102%	12%	106%	10%
ND8361	153	GcuuuAAcuuGCGccuGGTsT	154	CcAGGCCGcAAGUuAAAGTsT	83%	5%	82%	8%
ND8362	155	uAAcuuGGCGccuGGcGuTsT	156	CACGCCAGCCGcAAGUuATsT	119%	2%	115%	6%
ND8363	157	AcuuuuAcCuucAAAGuATsT	158	uACUuUGAAggGuAAAGGUTsT	17%	3%	13%	2%
ND8364	159	GGuuAcucAcGauGgcccTsT	160	AGGCCAUcGUGAGuAAcCTsT	104%	9%	117%	17%
ND8365	161	cAcGauGGcccuGGuGAcTsT	162	GUCACCGAGGCCcAUCGUTsT	140%	13%	100%	9%
ND8366	163	AGauGcuuAcGcGAcAGATsT	164	UUCUGUCGGAUAGcAUcUTsT	46%	2%	70%	6%
ND8367	165	AcGauGgucAcCuucCuGUTsT	166	AcAGGAGGGUGAcAUcGUTsT	85%	6%	128%	10%
ND8368	167	cuCCGAAGGcuuCGAAGccTsT	168	GcCUUCGGAACCUUCGAGTsT	12%	2%	18%	1%
ND8369	169	AAGSuucGAGccGUAcTsT	170	GUuUCGGCUUCGGAACCUUTsT	63%	7%	114%	19%
ND8370	171	GGuAcuGccucugAAcAcuTsT	172	AGUuUcAGAGGcAGuAcCTsT	36%	3%	71%	6%
ND8371	173	AGcuuugAcAAggAAcuuTsT	174	AAAGUUCcUUGUcAAAGCuTsT	17%	1%	21%	1%
ND8372	175	uuGAcAAngGAACuuucCuTsT	176	AGGAAGUUCcUUGUcAAATsT	16%	2%	26%	4%
ND8373	177	UGAcAAGGAcuuuucCuAATsT	178	UuAGGAAGUUCcUUGUcATsT	12%	1%	22%	5%
ND8374	179	cccGUAGcAcAcuAAcATsT	180	UGUuAAUGUGUGUAcCGGcTsT	41%	2%	75%	3%
ND8375	181	cAcUAAAcAuCuGcuGGATsT	182	UCCAGcAGAUguuAAAGUcTsT	17%	1%	26%	2%
ND8376	183	uuGcuGuugcAcAcuAAcuTsT	184	AAGuAUGGUcAAcAGcAATsT	45%	4%	69%	6%
ND8377	185	GUAcUGGcAAuuCGccuGcTsT	186	cAGGCCGAUUGCcAGUAcTsT	60%	6%	120%	8%
ND8378	187	uuCGccuUGcuuuucGGAGTsT	188	CUCCGAANAAGcAGGCCGAATsT	57%	5%	86%	11%
ND8379	189	ccuGcuuuucGGAGAGUAcTsT	190	GUAcUUCcGGAANAAGcAGGcTsT	43%	5%	50%	3%
ND8380	191	GcuuuucGGAGAGUAcuucTsT	192	GAAGUAcUUCcGGAANAAGcTsT	16%	2%	24%	2%
ND8381	193	cuuuucGGAGAGUAcuucATsT	194	UGAAcUAcUUCcGGAANAAGcTsT	12%	1%	16%	3%
ND8382	195	CAAccucAAcucGGAcAAAGTsT	196	CUUGUCCGAGUUGAGGUUGTsT	33%	2%	39%	3%
ND8383	197	CUAcCGAcAAuAcuAcuAcTsT	198	UGAUAGAUUGUcUGGUGAGTsT	13%	1%	23%	6%

ND8384	199	cUGucGAGGcuGccAGAGATsT	200	UCUCUGGcAGCCUCGAcAGTsT	11%	1%	18%	3%
ND8385	201	AAAcUGcuAuAcuuucAuTsT	202	AUUGAAAGuAUAGcAGUuuTsT	48%	8%	64%	11%
ND8386	203	GGcuuuAAcuUGcGGccuGTsT	204	CAGCCOGcAGUUAAGcCCTsT	55%	7%	70%	8%
ND8387	205	cuuuAAcuUGcGGccuGGcTsT	206	GCCAGCCCGcAAcGUuAAAGTsT	40%	11%	87%	14%
ND8388	207	AGGuGuGuAuucAcuccuGTsT	208	CAGGAGUGAuAcAcACCUTsT	45%	3%	41%	5%
ND8389	209	AcGAUGGcccccGGUGAcATsT	210	UGUcNOCCAGGGCCcAUCGUTsT	43%	2%	60%	9%
ND8390	211	cUGAAcAcucUGuucccTsT	212	GGGAAcCAGAGUGUUCAGTsT	33%	2%	48%	11%
ND8391	213	cuuuAAcuUGcGGAGuTsT	214	AcUCCAGcAGAUuuuuAGTsT	16%	1%	17%	4%
ND8392	215	GcAcAuAcuuucuuGAcTsT	216	GUAcAAGAAAGUuUGGUGCTsT	19%	1%	22%	4%
ND8393	217	uGUuAGccCAuAcuccuGTsT	218	CAGGAUGAuGGcGUAGAcATsT	69%	3%	92%	15%
ND8394	219	AGGAccuAGAcucucGcATsT	220	UGcAGAGGcUcAGGGUCCUTsT	94%	5%	86%	13%
ND8395	221	ccAccGcuccuAcGGAGTsT	222	CUcUCGGuAGGAGCGGUGTsT	55%	1%	65%	6%
ND8396	223	uAcCGAGAGcucuuCGAGuTsT	224	AcUCGAAGcUcUcGGuATsT	11%	1%	11%	1%
ND8397	225	AAcAUCCUGUGAGGcUcGCTsT	226	GcAGCCUcGAcAGcAGUuUUTsT	90%	7%	72%	11%
ND8398	227	GAAccuuuAcCCuuCAAAGTsT	228	CUUUGAAcGGUAAAGGUUcTsT	22%	2%	25%	4%
ND8399	229	GGUCCGAAGcCGAuAcUGTsT	230	CAGuAUcGGCUUCGGAAcCCTsT	93%	9%	89%	9%
ND8400	231	AAGccGAuAcUGGucuccATsT	232	UGGAGAcAGuAUcGGCUUUTsT	35%	2%	42%	9%
ND8401	233	ucUAGccCAuAcuccuGcuTsT	234	AGcAGGAUGAuGGcUAGATsT	95%	8%	95%	14%
ND8402	235	cGGcGccAuCCGccuGGuGTsT	236	cAcCAGGGcGUcGGCGCGTsT	81%	8%	89%	17%
ND8403	237	uuuuCGGAGAGuAcuuAcAGTsT	238	CUGNAGuAcUcUCCGAAATsT	13%	1%	13%	1%
ND8404	239	GAGAGuAcuuAcGUAcCCcTsT	240	GGGUAGCUGAAGuAcUCUCcTsT	71%	3%	100%	10%
ND8405	241	GAcGcucuuuGAcCuGAcTsT	242	GUAcAGGUCAAAGAGCGGUCcTsT	84%	5%	92%	13%
ND8406	243	uGuGuAuucAcuccuGcuuTsT	244	AAcGcAGGAGUGAAuAcAcATsT	78%	2%	89%	8%
ND8407	245	AAcAAcAAGAGAAuUGGAGTsT	246	CUCcAUUUCUCUGUUGUUTsT	66%	3%	88%	21%
ND8408	247	AuuGAAGGAuGuCGAGGcTsT	248	GCCUGcAcAUCCUAcAuTsT	25%	1%	36%	6%
ND8409	249	ucUcAGAGccGccAAAcuTsT	250	AGUUUGGGCGcUcUGAGATsT	18%	1%	24%	2%

ND8410	251	AAAcAcAAcAAAGGGUAcATsT	252	UGuACCCUUGSUUGUGUUUsT	21%	1%	35%	2%
ND8411	253	uACCCGUGCCUcAcAGAGTsT	254	CUCUGAGGGcAcGGGUATsT	57%	2%	67%	4%
ND8412	255	uAGcAcAcUuAAcAUcUGTsT	256	cAGAUGUuAAUGUGCUATsT	30%	2%	41%	1%
ND8413	257	GGuGUuAUucAcUccUGTsT	258	GcAGGAGUGAAuAcAcAcCTsT	73%	1%	90%	9%
ND8414	259	cAUgAUcAAAGGAGUGGCTsT	260	GcAcAcUCCUUGAUcAUgTsT	65%	2%	67%	5%
ND8415	261	AcUcAGAUgGccUcGGUsT	262	AcGAGGGcAUcGUGAGUsT	96%	6%	95%	6%
ND8416	263	GGAGcUUuGAcAAGGAcUtsT	264	AGUUCUUGUcAAAGCUcCTsT	24%	1%	28%	4%
ND8417	265	AuAcCCGUgGccUcAcAGATsT	265	UCUGUGAGGGcAcGGUuATsT	54%	1%	62%	2%
ND8418	267	GGAGUGGccAAAGUcAAcATsT	268	UGUUGAcUUUGGcAcUcCTsT	93%	2%	86%	11%
ND8419	269	AAcUcAAAAccAAuucUgTsT	270	cAGAAUUGUUUGuAGUUsT	101%	5%	108%	19%
ND8420	271	uGcUGGAGUgUUGcUgUUGTsT	272	cAAcAGcAAcAcUcCAGcATsT	29%	1%	26%	1%
ND8421	273	AGGucUccUgCAAcCAGGCTsT	274	GCCUGGUUGcAGGAGAcCUtsT	95%	10%	91%	17%
ND8422	275	cUuuGgcAUgAUgUAcUGTsT	276	CcAGUcAUcAUcUcCAAAGTsT	86%	3%	84%	6%
ND8423	277	cAUcUgCcAcCCUcAAUccCTsT	278	GGAUUGAGGGUcAGAUgTsT	82%	11%	73%	4%
ND8424	279	cGAcUgCcAcCAGAAUGGcTsT	280	GCCAUUCUUGGUcAGUcGTsT	70%	8%	69%	7%
ND8425	281	AAAcAcAAcAAcAAAGGGUAcTsT	282	GuACCCUUGGUUGUgUUUsT	95%	6%	106%	12%
ND8426	283	cAUcUGcUGGAGUgUUGcUtsT	284	AGcAAcAUcCAGcAGAUgTsT	30%	2%	37%	1%
ND8427	285	cCUAcAUcUcUcAUccCGTsT	286	CGGGAUAGAAAGAUgAGGTsT	42%	6%	30%	1%
ND8428	287	GcUAcAUcUcUcAUccGCTsT	288	GcGGAUAGAAAGAUgAGGCTsT	65%	7%	54%	3%
ND8429	289	GAGUGUAcCCcUuCCAcUtsT	290	AGUGGAAGCGGUAcCnCUcTsT	95%	11%	86%	19%
ND8430	291	GGUAcCCGcUcAcUAcUtsT	292	AUGuAGUGGAAGCGGUAcCTsT	111%	19%	96%	14%
ND8431	293	GuGUAcCCGcUcAcUAcTsT	294	GuAGUGGAAGCGGUAcCCTsT	98%	13%	52%	26%
ND8432	295	GAAUuAcUcUcAcUuCCAcTsT	296	GUGGAAGUGAGAAUUCUsT	111%	21%	73%	27%
ND8433	297	AAUuAcUcUcAcUuCCAcCTsT	298	GGUGGAAGUGAGAAUUsT	109%	22%	105%	7%
ND8434	299	uAcUcUcAcUuCCAcCCTsT	300	GGUGGGAAGUGAGAGUATsT	106%	23%	95%	7%
ND8435	301	AGUGGUAcCCcUuCCAcUATsT	302	uAGUGGAAGCGGUAcCAcUtsT	109%	18%	102%	9%

ND8436	303	GGC-AACUUCAUUCUcGccTsT	304	GGGAGAGUAAGUUGCCCTsT	109%	18%	107%	14%
ND-8501	305	AGCCCGUAGCGUGCCUCCTsT	306	GGAGCCACGCUACGGCCUtsT	84%	14%	69%	3%
ND-8502	307	CCGGUAUUGGUCACGGGTsT	308	CCGUGCACCAUUAACCcGGTsT	41%	6%	30%	2%
ND-8503	309	AUGCUAUCGGACAGAAcATsT	310	UGUUCUGUCGGGAUAGCAUtsT	11%	2%	10%	2%
ND-8504	311	UGCUAUCGGACAGAAcATsT	312	UUGUUCUGUCGGUAAGcATsT	15%	2%	10%	0%
ND-8505	313	GCCCGUUUAUGUAUGCCUcTsT	314	GGAGCAUACAUAAACGGGcTsT	23%	3%	16%	1%
ND-8506	315	GCCCGUAGCGUGCCUCCATsT	316	UGGAGCCACGCUAACGGGcTsT	32%	3%	22%	1%
ND-8507	317	CCGGAAUUUAAGAGGAGcTsT	318	GCUCUCUUUAUUUCCcGtsT	35%	4%	24%	1%
ND-8508	319	CCGAAGUUCCGAAGCCGATsT	320	UCGGUUCCGNAACCUIcGtsT	19%	2%	13%	1%
ND-8509	321	GCAAUUCGGCCUGUUUcTsT	322	GAAAAGCAGCCGAAUUGcTsT	12%	1%	8%	1%
ND-8510	323	GGGAAUUAUCUACUcUcTsT	324	GAAGUGAGAGUAUUCcGcTsT	21%	2%	18%	1%
ND-8511	325	GCGAAUUAUCUACUcUcTsT	326	GGAAUGAGAGUAUUCcGcTsT	12%	2%	8%	1%
ND-8512	327	AACCAGGGAAUUAUCUcTsT	328	GAGAGUAUUCGCCUGGtTsT	99%	11%	79%	5%
ND-8513	329	GGUAAUGGUGCACGGGcAGTsT	330	CUGCCCGUGCACCAUUAOCtsT	61%	6%	42%	4%
ND-8514	331	CUACAGUAGCCUCCUGUGTsT	332	CACGAGGGCACUCCUGAGTsT	94%	11%	70%	4%
ND-8515	333	GCUCGAGGUUCCGAAGcTsT	334	GCUUCGGAACCUICCGAGcTsT	18%	2%	17%	2%
ND-8516	335	GCCGAUACUGGUCUCCAGGtsT	336	CCUGGAGACCAGUAUCcGcTsT	14%	1%	12%	1%
ND-8517	337	CCGAUACUGGUCUCCAGGcTsT	338	GCCUGGAGACCAGUAUCcGcTsT	42%	5%	33%	2%
ND-8518	339	UGCUGUUGCACCAUAGUcUtsT	340	AAAGUAUGGUGCAACAGcATsT	10%	1%	9%	0%
ND-8519	341	AACGGUCUGUCCUGAUGcTsT	342	GCATCAGGGAACAGACCgUtsT	60%	7%	52%	8%
ND-8520	343	UUAAUUUGCGCCUGCGGUTsT	344	ACGCCAGGCCGCAAGUUAATsT	82%	25%	77%	18%
ND-8521	345	GCUGGUUACUACAGUUGcTsT	346	GCCAUUCGUGAUAACCAGcTsT	36%	4%	34%	7%
ND-8522	347	UUACUACAGUUGCCUUGTsT	348	CGAGGCCAUUCGUGAGUAATsT	105%	21%	113%	21%
ND-8523	349	GAAGCCGAUACUGGUUCCUcTsT	350	GGAGACCAGUAUCGGUcUcTsT	24%	2%	18%	2%
ND-8524	351	GAUACUGGUCUCCAGCCGtsT	352	CGGCCUGGAGACCAGUAUcTsT	30%	5%	25%	3%
ND-8525	353	AUACUGGUCUCCAGGCCGATsT	354	UCGGCCUGGAGACCAGUAUtsT	12%	1%	11%	2%

ND-8526	355	CAACGGUCUGCCUGAUGTST	356	CAUCAGGGAAGACCGUUGTST	24%	7%	24%	2%
ND-8527	357	UUUAACUUGGGCCUGGGTST	358	CGCCAGGCCGCAAGUUAATST	122%	6%	107%	9%
ND-8528	359	UACUCACGATGGCCUCGGTST	360	CCGAGGGCCAUCCGUGAGUATST	78%	6%	84%	7%
ND-8529	361	UUUCGGAGAGUACUUCAGCTST	362	GCUGAAGUACUCUCCGAATST	87%	18%	80%	17%
ND-8530	363	GCAGACGCUUUGACCUGTST	364	CAGGTCAAAGAGGUCUGCTST	14%	2%	13%	0%
ND-8531	365	CUACAUCUUCUUCGCGGTST	366	CCGCGGUAAGAGUAGTST	20%	4%	18%	3%
ND-8532	367	AGCGAAUUAUCUACUUTST	368	AAGUGAGUAUUCGCCUUTST	25%	5%	18%	1%
ND-8533	369	CCGCUCAACCCAGGUCUCCSTST	370	GCAGAACUUGUAGAGCGTST	30%	11%	22%	2%
ND-8534	371	CAACCGCAUAGAAGCGCCSTST	372	GGCCGUCUUAUGCGGUUGTST	33%	4%	23%	1%
ND-8535	373	AUGAAGACGGCCUUCUGGGTST	374	CCCAGAAGCGGUCUUCAUTST	114%	12%	84%	15%
ND-8536	375	AGCACACCGCAUGAAGACTST	376	GUCUUCAUUGGGUUGUGCUTST	18%	1%	16%	3%
ND-8537	377	UCGAGUUCACCGCUCCUATST	378	UAGGAGCGGUGGAUCUGATST	25%	0%	26%	3%
ND-8538	379	CUGCCUUAACAGACAUACTST	380	GUUUGUCUGUAGAGCAGTST	12%	1%	13%	2%
ND-8539	381	GAGGGAGUGUAACCGCUUCTST	382	GAAGCGUAACCAUCCUUCTST	43%	1%	47%	14%
ND-8540	383	CCUUUAUGGAUGAUGGUGTST	384	CCACCAUCAUCCAUAAAGTST	61%	5%	60%	8%
ND-8541	385	UGAGGGAGUGUACCGCUUTST	386	AAGCGUACCAUCCUCCATST	36%	5%	35%	5%
ND-8542	387	CCUGCAACCGGCGAAUUAATST	388	UAUUUGCCUGGUUGCAGGTST	19%	2%	16%	1%
ND-8543	389	GGCUUGGUGGAGACCUCTST	390	GAGGUUCCACGCCAGGCTST	28%	7%	20%	2%
ND-8544	391	UGCUUUUCGAGAGUACUUTST	392	AAGUACUUCGCCAAAGCATST	22%	5%	17%	1%
ND-8545	393	CCGUAAGGUGGCUCCAGTST	394	CUGGAGGOCACGCUACGGTST	25%	3%	22%	2%
ND-8546	395	CCGUAAGGUGGCUCCAGTST	396	GCUGAGGCCACGCUACGGTST	62%	5%	57%	9%
ND-8547	397	CCAGGGAUUUAUCUCUACTST	398	GUGAGUAUUUGCCUUGTST	23%	11%	16%	2%
ND-8548	399	GAACUGCUUAUUAUUAATST	400	UUUAAAGUAUAGCAGUUCUUTST	9%	3%	3%	0%
ND-8549	401	GCCCGGUAUUGGUCACGCTST	402	CGUGCACAUUACCCGGCTST	87%	9%	92%	14%
ND-8550	403	CCGGUUAUUGGUCACGCTST	404	CCGUGCACAUUACCCGGTST	19%	12%	14%	1%
ND-8551	405	CCGGUUAUUGGUCACGCTST	406	GCCCGUACCAUUAACCGCTST	68%	11%	73%	3%

ND-8552	407	GGUUAUUGGUGCAGCGCATsT	408	UGCCCGUGCACC AUUACCOsTsT	30%	6%	33%	2%
ND-8553	409	UAUUGGUGCAGCGGAGGATsT	410	UCUUGCCCGUGCACC AUUATsT	29%	3%	31%	1%
ND-8554	411	CUUGUUAUCACGAUGGCOCTsT	412	GGCCAUCUGUGAGUAACCAGTsT	74%	15%	66%	8%
ND-8555	413	GUUACUCACGAUGGCCUUCTsT	414	GAGGCCAUCCGUGAGUAACsT	91%	21%	88%	10%
ND-8556	415	UGUCACGAUGGUACCCUCTsT	416	GAGGUGACCAUCUGUGACATsT	72%	4%	76%	12%
ND-8557	417	UGCUCCGAAGGUUCOSAGTsT	418	CUUCGGAACCUUCGGAGCATsT	51%	2%	59%	18%
ND-8558	419	UCCGAAGGUUCCGAGCCGTsT	420	CGGCUUCGGAAACCUUCGGATsT	109%	11%	77%	13%
ND-8559	421	UUCGGAAGCGAUUACUGGUTsT	422	ACCAGUAUCGGCUUCGGAAATsT	46%	20%	33%	6%
ND-8560	423	AGCCGAUACUGGUUCUCCAGTsT	424	CUGGAGACCAGUAUCGGCTsT	15%	6%	10%	1%
ND-8561	425	CUUGGUACUGCCUCUGAACTsT	426	GUUCAGAGGCAGUACCAAGTsT	16%	3%	12%	3%
ND-8562	427	CUCCCGUAGCACACUAUAATsT	428	UUUAUAGUGUCUACGGGAGTsT	14%	6%	10%	1%
ND-8563	429	UCCCGUAGCACACUAUAATsT	430	GUUAUAGUGUCUACGGGATsT	43%	11%	36%	4%
ND-8564	431	UGCACCAUAUUUCUUGUATsT	432	UACAAGAAGUAUGGUGCATsT	17%	6%	13%	3%
ND-8565	433	UUGCCCGUUUAUGUAUGCUTsT	434	AGCAUACUAUAAACGGCAATsT	84%	2%	103%	12%
ND-8566	435	UGCCCGUUUAUGUAUGCUTsT	436	GAGCAUACUAUAAACGGGATsT	69%	25%	93%	4%
ND-8567	437	GGACCCUAGACCUCUCCAGTsT	438	CUCCAGAGGUUCUAGGCUCTsT	29%	8%	33%	2%
ND-8568	439	CCUAGACCUCUGCAGCCCATsT	440	UGGCUUGCAGAGGUUCUAGTsT	18%	2%	19%	1%
ND-8569	441	UGGCAUGAUGUACUGGCAATsT	442	UUGCCAGUACAUUACUGCCATsT	19%	3%	20%	5%
ND-8570	443	UACUGGCAUUUCGGCUGCTsT	444	GCAGGCCGAAUUUGCCAGUATsT	86%	15%	83%	16%
ND-8571	445	AAUUCGGCUGCUUUUCGGTsT	446	CCGAAAGCAGGCCGAAUUTsT	19%	3%	24%	4%
ND-8572	447	CUUCUUUCGGACAGUACUTsT	448	AGUACUUCOCGAAAGCAGTsT	8%	2%	12%	2%
ND-8573	449	UUCGGAGAGUACUUCAGCUTsT	450	AGCUAAGUACUUCUCCGAAATsT	27%	3%	40%	5%
ND-8574	451	AGCAGACGCUCUUGACCUATsT	452	AGGUCAAAGAGCGUCUGCUTsT	15%	0%	19%	4%
ND-8575	453	CUUCGAGCGCUCUAGGGUCTsT	454	GACCCUCAGCGCUCUCCAGTsT	35%	1%	40%	4%
ND-8576	455	UGGCUUUUAUCUUCGGCCUTsT	456	AGGCCGCAAGUUAAGCCATsT	47%	3%	53%	8%
ND-8577	457	GCUUUUAUCUUCGGGCUUGTsT	458	CCAGGCGCAAGUUAAGCTsT	20%	2%	25%	5%

ND-8578	459	UAACUUGCGGCCUGGCGUGTsT	460	CACGCCAGGCGCGCAAGUUAATsT	75%	7%	82%	4%
ND-8579	461	ACCUUAACCCUUAACAAGUATsT	462	UACUUGAAGGGUAAAGGUTsT	14%	2%	17%	3%
ND-8580	463	GGUUAUCACAGUUGGCCUUTsT	464	AGGCCAUCUGAGUAACCTsT	63%	5%	70%	11%
ND-8581	465	CACSAUGGCCCUUGGUGACTsT	466	GUCACCGAGGGCCAUUGUGTsT	56%	2%	50%	5%
ND-8582	467	AGAUUCUUAUUGCGACAGAAATsT	468	UUCUGUCGCGAUAGCAUCUTsT	18%	1%	18%	1%
ND-8583	469	ACGAUGGUCACCCUCCUGUTsT	470	ACAGGAGGGUGACCAUCGUTsT	48%	3%	52%	6%
ND-8584	471	CUCCGAAGGUUCCGAAAGCCTsT	472	GGCUUCGGNAACCUCCGGAGTsT	18%	2%	20%	5%
ND-8585	473	AAGGUUCGGAAGCGCAUACTsT	474	GUUUCGGCUUCGGAAACCUUTsT	26%	2%	28%	1%
ND-8586	475	GGUACUGCCUUCUGAACACUTsT	476	AGUUCUCAGAGGCGAGUACCTsT	12%	1%	12%	1%
ND-8587	477	AGCUUUGACAAGGAACUUUTsT	478	AAAGUUCUUGUCAAAAGCUTsT	17%	2%	18%	2%
ND-8588	479	UUUGACAAGNAACUUUCUTsT	480	AGGAAGUUCUUGUCAAATsT	78%	5%	73%	2%
ND-8589	481	UGACAAGNAACUUCCUAATsT	482	UUAGGAANGUUCUUGUCATsT	14%	1%	16%	1%
ND-8590	483	CCCGUAGCACACUAUAACATsT	484	UGUUAUAGUGUGCUACGGCTsT	9%	1%	11%	2%
ND-8591	485	CACUAUAACAUUCUGCUGGATsT	486	UCCAGCAGAUUUAUAGUGTsT	18%	2%	20%	2%
ND-8592	487	UUUCUUGUUGCACCAUACUUUTsT	488	AAGUUAUGGUGCAACAGCAATsT	23%	2%	25%	8%
ND-8593	489	GUACUGGCAAUUUGGCCUUGTsT	490	CAGGCCGAAUUGCCAGUACTsT	66%	3%	62%	4%
ND-8594	491	UUUGGCCUUGCUUUUGGAGTsT	492	CUCCGAAAGCAGGCCGGAATsT	97%	7%	86%	8%
ND-8595	493	CCUGCUUUUUGGAGAGUACTsT	494	GUACUCUCCGNAAGCAGGCTsT	11%	2%	14%	3%
ND-8596	495	GCUUUUCGGAGAGUACUUTsT	496	GAAAGUACUCUCCGAAAAGCTsT	12%	1%	17%	2%
ND-8597	497	CUUUUUGGAGAGUACUUCATsT	498	UGAAGUACUCUCCGAAAAGTsT	11%	1%	14%	2%
ND-8598	499	CAACCUCAACUCCGACAAAGTsT	500	CUUUCUCCGAGUUGAGUUGTsT	15%	2%	16%	2%
ND-8599	501	CUUACAGACAUACUCAUATsT	502	UGAUGAGUUGUCUGGUAAGTsT	17%	1%	18%	2%
ND-8600	503	CUUUCGAGGCCUCCAGAGATsT	504	UCUUGGCAGCCUCCAGCAGTsT	17%	0%	16%	1%
ND-8601	505	AAAGTGCUAUACUUUCAUATsT	506	AUUGAAGUAUAGCAGUUTsT	28%	1%	26%	1%
ND-8602	507	GGCUUAACUUUGGCCUUGTsT	508	CAGGCCGAAAGUUAAGGCTsT	21%	2%	18%	1%
ND-8603	509	CUUUAACUUUGGCCUUGGCTsT	510	GCCAGGCCGCAAGUUAAGTsT	81%	2%	69%	6%

ND-8604	511	AGGUGUUAUUCACUCCUGTsT	512	CAGGAGUAGUAUACACACCUtsT	47%	4%	40%	1%
ND-8605	513	ACGAUGGCCUUGGUGACATsT	514	UGUCACCGAGGGCCAUUCGtsT	40%	6%	35%	2%
ND-8606	515	CUGAACACUCUGGUUCCtsT	516	GGGAACACAGAGUGUUCAGTsT	60%	2%	75%	4%
ND-8607	517	CUAUAACAUUCUGGAGUsT	518	ACUCCAGCAGUAUUAUAGTsT	17%	1%	24%	3%
ND-8608	519	GCACCAUACUUUCUUGUACTsT	520	GUACAAGAAAGUAUGGUGCTsT	10%	1%	15%	3%
ND-8609	521	UGUCUAGCCCAUCAUCCUGTsT	522	CAGCAUAGUGGGCUAGACATsT	62%	2%	75%	12%
ND-8610	523	AGGACCCUAGACCCUUGCATsT	524	UGCAGGGUCUAGGGUCCUsT	61%	5%	73%	10%
ND-8611	525	CCACCGUCCUACCGAGAGTsT	526	CUUCUGGUAAGGAGCGGUGTsT	21%	2%	29%	5%
ND-8612	527	UACCGAGAGCUUCUGAGUsT	528	ACUCGAGAGCUUCGGUATsT	13%	1%	22%	3%
ND-8613	529	AACAUCUUGCGAGGCUUGCTsT	530	GCAGCUUGACAGGAUGUUsT	57%	2%	70%	4%
ND-8614	531	GAACUUUAACCCUUCAAAGTsT	532	CUUUGAAGGGUAAGGUUCTsT	13%	3%	16%	2%
ND-8615	533	GGUUCGAAAGCCGAUACUGTsT	534	CAGUATCGGCUUCGGAAOCTsT	18%	1%	24%	2%
ND-8616	535	AAGCCGAUACUGGUCUCCATsT	536	UGGAGACCAGUAUCGGCUUsT	19%	1%	25%	2%
ND-8617	537	UCUAGCCCAUACUCCUGCUtsT	538	AGCAGGAUGAUGGGCUAGATsT	93%	3%	101%	3%
ND-8618	539	CGCGCCAUCCGCCUUGGUsT	540	CACCAGGCGGAUGGGCCCGTsT	85%	4%	99%	4%
ND-8619	541	UUUUCGGAGAGUAUUUCAGTsT	542	CUGAAGUACUCUCCGAAATsT	63%	2%	77%	3%
ND-8620	543	GAGAGUACUCAGCUACCCTsT	544	GGUAGCUGAAGUACUCUCtsT	26%	1%	30%	4%
ND-8621	545	GACGCUCUUUGACCUUGUACTsT	546	GUACAGGUCAAAGAGCGUCTsT	17%	2%	19%	3%
ND-8622	547	UGUUAUUCACUCCUGCUUsT	548	AAGCAGGAGUAUACACATsT	49%	3%	58%	11%
ND-8623	549	AACAACAGAGAAUUGGAGTsT	550	CUCCAUUUCUUGUUGUUsT	74%	7%	70%	4%
ND-8624	551	AUUGAAGGAUGUGCAGGGCTsT	552	GCOCUGCACAUCCUCAAUsT	85%	6%	87%	12%
ND-8625	553	UCUAGAGCGCCCAACUsT	554	AGUUUGGCGCCUCUGAGATsT	53%	3%	51%	6%
ND-8626	555	AAACACAACCAAGGGUACATsT	556	UGUACCCUUGGUUGUUsT	17%	2%	18%	2%
ND-8627	557	UACCCGUGCCUUCACAGAGTsT	558	CUUCUGAGGGCACCGGUATsT	58%	3%	55%	3%
ND-8628	559	UAGCACACUAUAACAUCUGTsT	560	CAGAUUAUAGUGUGCUATsT	64%	3%	64%	15%
ND-8629	561	GGUGUUAUUCACUCCUGCTsT	562	GCAGGAGUAUACACACCTsT	25%	3%	23%	2%

ND-8630	563	CAUGAUCAAAGGAGUGGCTST	564	GCCACACUCCUUGAUCUAUGTST	32%	2%	28%	2%
ND-8631	565	ACTACAGAUAGCCUCCGGUTST	566	ACCGAGGGCCACUGGAGUTST	96%	1%	88%	4%
ND-8632	567	GGAGCUUGACAAAGAACUTST	568	AGUCCUUGUCAAGCUCCTST	14%	1%	14%	2%
ND-8633	569	AUACCGUGGCCUCACAGATST	570	UCUGAGGGCACGGUAUTST	21%	2%	16%	1%
ND-8634	571	GGAGUGGCCAAGUCAACATST	572	UGUGACUUUGCCACUCCSTST	21%	3%	16%	1%
ND-8635	573	AAUACAATAACCAUUCUGTST	574	CAGAUUGGUUUUGUAGUUTST	49%	5%	37%	3%
ND-8636	575	UGCUGGAGUGUUGCUUUGTST	576	CAACAGCAACAUCCAGCATST	27%	3%	21%	2%
ND-8637	577	AGGUCUCCUCCAACAGGCTST	578	GCCUGGUUGCAGGAGACCUSTST	62%	8%	61%	4%
ND-8638	579	CUUUGGCAUGAUGUACUGGTST	580	CCAGUACAUCAUGCCAAAGTST	66%	6%	52%	8%
ND-8639	581	CAUCUGCACCCUCAAUCCCTST	582	GGGAUUGAGGGUCCAGAUGTST	50%	7%	40%	4%
ND-8640	583	CGACUGCACCCAAAGAUAGGCTST	584	GCCAUUCUUGGUGCAGUCGTST	67%	6%	54%	5%
ND-8641	585	AAACACAAACCAAGGUACTST	586	GUACCCUUGGUUGUUGUUUTST	14%	2%	14%	1%
ND-8642	587	CAUCUGCUGGAGUGUUGCUTST	588	AGCAACACUCCACAGAUGTST	13%	2%	13%	1%
ND-8643	589	CCUACAUUCUUAUCCGGTST	590	CGGGUAGAGAUAGGCTST	15%	4%	13%	0%
ND-8644	591	GCCUACAUCUUAUCCGCTST	592	GCGGUAAGAGAUAGGCTST	14%	3%	11%	1%
ND-8645	593	GAGUGUACCGCUUCCACUTST	594	AGUGGAACCGUACCACUCSTST	16%	0%	20%	1%
ND-8646	595	GGUACCGCUUCCACUACAUFTST	596	AUGUAGUGGAAGCGGUACCTST	12%	0%	14%	1%
ND-8647	597	GUGGUACCGCUUCCACUACTST	598	GUAGUGGAAGCGGUACCCTST	42%	4%	44%	3%
ND-8648	599	GAUUACUCUCACUCCACTST	600	GUGGAUGAGAGUAUUUCSTST	10%	1%	11%	3%
ND-8649	601	AAUUACUCUCACUCCACTST	602	GGUGGAUGAGAGUAUUUTST	105%	10%	102%	8%
ND-8650	603	UACUCUCACUCCACACCTST	604	GGUGGUAGAGUGAGUATST	55%	6%	54%	8%
ND-8651	605	AGUGGUACCGCUUCCACUATST	606	UAGUGGAAGCGGUACCACUTST	57%	6%	59%	12%
ND-8652	607	GGCAACUUAUCUUCGCTST	608	GGGAGAGUAAGUUGCCCTST	47%	12%	36%	7%

5

Tabla 1B: ARNsi(s) seleccionados en el conjunto de detección ampliado (ARNsi(s) “solo-humano”). Otras 344 secuencias de ARNi se identificaron y fueron diseñadas para ser completamente complementarias a las secuencias de alfa-ENaC humanas, de acuerdo con el criterio de diseño descrito en la sección de los ejemplos. Todos los ARNsi(s) enumerados en este conjunto de detección fueron modificados solo con un liagamiento fosforotioato en el extremo 3' entre los nucleótidos 20 y 21 de cada cadena. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en un ensayo de transfección dosis-única (consultar la sección de ejemplos para los métodos utilizados).

ID. Duplex	ID. Seq	Sentido	ID. Seq	Antisentido	Primera Evaluación Dosis única @ 50nM en H441; MV	SD
ND-10445	609	CUGCGCUAAGUCUCUUUUUtsT	610	AAAAGAGACUUAGCCCGAGTsT	94%	8%
ND-10446	611	AUCCGACAGAACAAUUUACTsT	612	GUAAUUGUUUCUGCCGCAUTsT	13%	2%
ND-10447	613	UCGCGACAGAACAAUUUACATsT	614	UGUAAUUUGUUUCUGCCCGATsT	18%	1%
ND-10448	615	CCCGUUUAUGUUGCUCCATsT	616	UGGAGCAUACAUAACGGTsT	41%	1%
ND-10449	617	CCCGGUAAGUAAAGCCAGTsT	618	CUGCCUUUACUUACCCGGTsT	23%	1%
ND-10450	619	GGUACCCGGAAUUUAAAGAsT	620	UCUUUAAUUUCGGGUACCTsT	14%	2%
ND-10451	621	GCUAUCCGGACAGACAUAUsT	622	AUUUUUCUGUCGGAUAGCTsT	24%	2%
ND-10452	623	UAUCGACAGAACAAUUUAUsT	624	UAUUUGUUGUCGGGAUATsT	12%	1%
ND-10453	625	UGCGCUAAGUCUCUUUUUUsT	626	AAAAGAGACUUAGCCCGATsT	46%	3%
ND-10454	627	GGCGAUUAUUGCGACUGCATsT	628	UGCAGUCGCAUAUUGGCTsT	14%	0%

ND-10455	629	AUGUCUAGCCCAUCAUCCUtsT	630	AGGAUGAUGGGCUAGACAUTsT	12%	2%
ND-10456	631	CUACAGGUACCCGGAAAUtsT	632	AAUUOCCGGUACCUUGAGTsT	28%	2%
ND-10457	633	CCGUCGACCCGUAGCGUGtsT	634	CACGCUACGGGCUCCGACGGTsT	27%	3%
ND-10458	635	CGGACAGACAACAAUACACTsT	636	GUGAAUUGUUUCUGUCGGTsT	39%	7%
ND-10459	637	AGGUACCCGGAAAUUAAGTsT	638	CUUAAUUUCCGGUACCUtsT	30%	3%
ND-10460	639	CAUGCACGGUUUCCUGCCtsT	640	GGCAGGAAACCCGUGCAUGTsT	95%	6%
ND-10461	641	AGCUUGCGGGACAACAACCTsT	642	GGUUGUUGUCCCGCAAGCUtsT	94%	8%
ND-10462	643	ACUGCGGCUAAGUCUCUtsT	644	AAAGAGACUUAGCCGCCAGUsT	13%	2%
ND-10463	645	CAUCCCUUAGAACCCUGCUtsT	646	AGCAGGGUUCUAAGGGGAUGTsT	18%	1%
ND-10464	647	ACCCGGUAAGUAAAGGCATsT	648	UGCCUUUACUUACCCGGGUsT	41%	1%
ND-10465	649	GAUUAUGGCGACUGCACCATsT	650	UGGUGCAGUCGCCAUAAUcTsT	23%	1%
ND-10466	651	CUCGGACAAGCUCGUCUcTsT	652	GAAGACGAGCUUGUCCGAGTsT	14%	2%
ND-10467	653	GCGAUUAUGGCGACUGCACTsT	654	GUGCAGUCGCCAUAAUCCGCTsT	24%	2%
ND-10468	655	AAUUAACCCGUAACAACATsT	656	UGUUUUGACGGUGUAUUsT	12%	1%
ND-10469	657	AACUGCCGUUGAUGUGGGTsT	658	CCACACAUAACGGCAGUUsT	46%	3%
ND-10470	659	AACUGCGGCUAAGUCUCUtsT	660	AAGAGACUUAGCCGCAGUUsT	14%	0%

ND-10471	661	CCGCUGAUACCAGGACAATsT	662	UUGUCUUGGUUAUCAGCGGTsT	12%	2%
ND-10472	663	AAGGGUACACGCAGGCAUGTsT	664	CAUGCCUGCGUGUACCCUUTsT	28%	2%
ND-10473	665	CCGGUAAGUAAGGCAGATsT	666	UCUGCCUUUACUUACCCGGTsT	27%	3%
ND-10474	667	CCCAUACCAGGUUCUAUGGTsT	668	CCAUGAGACCUGGUUAGGGTsT	39%	7%
ND-10475	669	AUUUUGGGACUGCACCAAATsT	670	UUGGUGCAGUCGCCAUJAUTsT	30%	3%
ND-10476	671	AUGCACGGUUUCCUGCCCTsT	672	GGCAGGAAACCCGUGCAUTsT	95%	6%
ND-10477	673	CUAGCCUCCACAGUCCACTsT	674	GUGGACUGUGGAGGGCUAGTsT	43%	7%
ND-10478	675	CAGGUACCCGGAAUUAAATsT	676	UUUAAUUUCCGGGUACCUUGTsT	11%	1%
ND-10479	677	AAUACAGCUCCUUCACCACTsT	678	GUGGUGAAGGAGCUGUAUUTsT	30%	3%
ND-10480	679	CACGGUUUCCUGCCACGCTsT	680	GCUGGGCAGGAJACCUGUGTsT	19%	1%
ND-10481	681	GGACUGAAUCUUGCCCGUUTsT	682	AACGGGCAAGAUUCAGUCCTsT	14%	2%
ND-10482	683	CGUUUAUGUAUGUCUCCAUGTsT	684	CAUGGAGCAUACAUAAAACGTsT	15%	1%
ND-10483	685	GGGUACUGCUACUUAAGCTsT	686	GCUUUAUGUAGCAGUACCCCTsT	11%	0%
ND-10484	687	UCGGUGUUGUCUGUGGUGGTsT	688	CCACCACAGACAACACCCGATsT	65%	5%
ND-10485	689	AAACUGCCGUUGAUGUGUGTsT	690	CACACAUCAACGGCAGUUTsT	73%	6%
ND-10486	691	GCGAAACUUGGAGCUUUGATsT	692	UCAAAAGCUCCAAGUUUCGCTsT	8%	1%

ND-10487	693	GGCCCGUCGAGCCCGUAGCTsT	694	GCUACGGGCUCCGACGGGCTsT	26%	3%
ND-10488	695	GCGACAGAACAAUUACACCTsT	696	GGUGUAAUUUUUCUGUCGCTsT	10%	2%
ND-10489	697	GCGACGGCUUAAGCCAGCCTsT	698	GGCUGGCUUAAGCCGUCGCTsT	50%	1%
ND-10490	699	GACCCGGUAAGUAAGGCTsT	700	GCCUUACUUACCCGGGUCTsT	74%	1%
ND-10491	701	UUGAUCAUCCGCCUUCUCTsT	702	GAGAAGGGGAGUGAUCAATsT	80%	7%
ND-10492	703	UCUAGCCCUCCACAGUCCATsT	704	UGGACUGUGGAGGGCUAGATsT	69%	4%
ND-10493	705	GUUUCACCAAGUGCCGGAATsT	706	UUCCGGCACUUUGGUGAAACTsT	23%	3%
ND-10494	707	CUCAACUCGGACAAGCUCGTsT	708	CGAGCUUGUCCGAGUUGAGTsT	45%	6%
ND-10495	709	CAACUCGGACAAAGCUCGUCTsT	710	GACGAGCUUGUCOGAGUUGTsT	23%	3%
ND-10496	711	ACCCGGAAAUUAAAGAGGATsT	712	UCCUCUUUAUUUCCGGGUTsT	13%	2%
ND-10497	713	CCCGAAAUUAAAGAGGAGTsT	714	CUCCUCUUAAUUUCCGGGTsT	19%	1%
ND-10498	715	CACCACUCUCGUGGCCGGCTsT	716	GCOGGCCACGAGAGUGGUTsT	94%	11%
ND-10499	717	CGUCGAGCCCGUAGCGGUGTsT	718	CCACGCUACGGGCUCCGACGCTsT	13%	1%
ND-10500	719	GCUUGGGGACAAACACCCCTsT	720	GGGUUGUUGUCCCGCAAGCTsT	49%	2%
ND-10501	721	GAUUCAAACGCGUCUGUCTsT	722	GACAGACOGUUGUUGAUUCTsT	18%	2%

ND-10502	723	GGCGAUUAUGGCGACUGCTsT	724	GCAGUOGCCAUAAUUCGCCCTsT	8%	1%
ND-10503	725	CGAUUAUJGGGACUGCAOCTsT	726	GGUGCAGUCGCCAUAAUUCGTsT	17%	1%
ND-10504	727	UCUGCUGGUUACUCACGAUTsT	728	AUCGUGAGUAAACCAGCAGATsT	38%	4%
ND-10505	729	CUAUCGGCAGACAACAAUUTsT	730	AAUUGUUCUGUCGCCGAUAGTsT	9%	1%
ND-10506	731	CAAUACACOGUCAACAAsTsT	732	GUUGUUGACGGUGUAUUGTsT	11%	1%
ND-10507	733	ACCGUCAACAACAAGAAATsT	734	UUCUCUUGUUGUUGACGGUTsT	9%	1%
ND-10508	735	CUCCUCCGUGUUGUCUGTsT	736	CACAGACAACACCGAGGAGTsT	78%	5%
ND-10509	737	GGAGGUA GCCUCCACCUCUGTsT	738	CAGGGUGGAGGCUACCUCCTsT	18%	1%
ND-10510	739	GGAGAGGUUUCACACCCATsT	740	UGGUGUGAGAAACCUCUCCTsT	13%	1%
ND-10511	741	CUGCCGUUGAUGUGUGGAGTsT	742	CUCCACACAUCACGGCAGTsT	19%	2%
ND-10512	743	UGCCGUUGAUGUGUGGAGTsT	744	CCUCCACACAUCACGGCATsT	82%	4%
ND-10513	745	AGAUGGGUAAGGCCUCAGGTsT	746	CCUGAGCCUUJACCCAUcUTsT	24%	1%
ND-10514	747	AGAACAGUAGCUGAUGAAGTsT	748	CUUCAUCAGCUACUGUUCUTsT	15%	0%
ND-10515	749	GCGGCUAAGUCUCUUUUcUTsT	750	GAANAAGAGACUUAGCCGCTsT	13%	1%
ND-10516	751	CCUAAGAAACCUCUGAUAATsT	752	UUUAUCAGGGUUUCUUAGGTsT	6%	0%

ND-10517	753	GAAACCGCUGAUAAACCAGGTsT	754	CCUGGUUAUCAGCGGUUUCTsT	13%	0%
ND-10518	755	AACCGCUGAUAAACCAGGACTsT	756	GUCCUGGUUAUCAGCGGUUUTsT	42%	2%
ND-10519	757	ACCGCUGAUAAACCAGGACATsT	758	UGUCCUGGUUAUCAGCGGUUTsT	11%	1%
ND-10520	759	CCAAAGGUACACGCGGCAATsT	760	UGCCUGCGUGUACCCUUGGTsT	19%	1%
ND-10521	761	CAAGGUACACGCGGCAUTsT	762	AUGCCUGCGUGUACCCUUGTsT	12%	0%
ND-10522	763	AGGGUACACGCGGCAUGCTsT	764	GCAUGCCUGCGUGUACCCUTsT	23%	1%
ND-10523	765	GUACACCGCAGGCAUGCCTsT	766	CGUGCAUGCCUGCGUGUACTsT	27%	1%
ND-10524	767	AGGCAUGCACGGGUUCCUTsT	768	AGGAAACCGUGCAUGCCUTsT	14%	0%
ND-10525	769	GGCAUGCACGGGUUCCUGTsT	770	CAGGAAACCGUGCAUGCCUTsT	18%	3%
ND-10526	771	ACGGGUUCCUGCCCGCTsT	772	CGCUGGGCAGGAAACCCGUTsT	30%	1%
ND-10527	773	GAGCAGACCGGGUAAGUATsT	774	UACUUACCCGGGUCUGCUCtTsT	24%	2%
ND-10528	775	AGCAGACCGGGUAAGUAATsT	776	UUACUUACCCGGGUCUGCUTsT	24%	2%
ND-10529	777	GGGUAAGUAAGGCAGACCTsT	778	GGUCUGCCUUUACUUACCCCTsT	39%	3%
ND-10530	779	AGCCUCAUAACCGUGCCCTsT	780	AGGCACCGGUAUGAGGCTsT	82%	5%
ND-10531	781	GUGAACGCUUCUGCCACAUTsT	782	AUGUGGCAGAAAGGUUACACTsT	13%	1%

ND-10532	783	AAAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	784	AAGCGGAGUGAUCAAUUUTsT	18%	2%
ND-10533	785	AAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	786	GAAGCGGAGUGAUCAAUUUTsT	19%	0%
ND-10534	787	GCCUUGCGGUCAGGACUGTsT	788	CAGUCCUUGACC CGAAGGCTsT	12%	1%
ND-10535	789	CUUGCGGUCAGGACUGAATsT	790	UUCAGUCCUUGACC CGAAGTsT	11%	0%
ND-10536	791	UUGCGGUCAGGACUGAATsT	792	AUUCAGUCCUUGACC CGAATsT	12%	0%
ND-10537	793	AUGUAUGCUCCAUGUCUAGTsT	794	CUAGACAUGGAGCAUACAUTsT	21%	1%
ND-10538	795	AGCAAAGUAGGCAGGAGCUCTsT	796	GAGCUCCUUGCCUACUUGCUTsT	19%	1%
ND-10539	797	CAGCCCAUACCAGGUCUCATsT	798	UGAGACCUUGGUAUGGCGUGTsT	27%	2%
ND-10540	799	CAGCCGUCGGACCUUGCGGTsT	800	CCGCAGGUCGCGACGCGUGTsT	44%	4%
ND-10541	801	GGCCCGUCGAGCCCGUAGTsT	802	CUACGGGCUCGACGGGCCCTsT	71%	6%
ND-10542	803	CGUAGCGUGGCCUCCAGCUTsT	804	AGCUGGAGGCCACGCUACGTsT	84%	9%
ND-10543	805	GGUGAGGGAGUGGUACCGTsT	806	GCGGUACCACUCCUACCTsT	108%	8%
ND-10544	807	AAAGUACACACAGCAGGUGTsT	808	CACCUCUGUGUGUACUUUTsT	140%	7%
ND-10545	809	CCAGGUUGACUUCUCCUCATsT	810	UGAGGAGAAUCUACCUGGTsT	18%	2%
ND-10546	811	UGUUUACACCAAGUGCCGGATsT	812	UCCGGCACUUGGUGAAACATsT	31%	2%

ND-10547	813	UGCUGGUUACUCACGAUGGTsT	814	CCAUCGUGAGUAACCAGCATsT	144%	10%
ND-10548	815	UCCUCGGUGUUGUCUGUGGTsT	816	CCACAGACAACACCGGATsT	106%	14%
ND-10549	817	AGGUAGCCUCCACCCUGGTsT	818	GCCAGGGUGGAGGCUACCUtTsT	74%	15%
ND-10550	819	GCCGUUGAUGUGUGGAGGTsT	820	CCCUCACACAUCAACGGCTsT	26%	4%
ND-10551	821	GAUGGGUAAGGGCUCAGGATsT	822	UCCUGAGCCUUACCCAUCTsT	22%	1%
ND-10552	823	CCCAACUGCGGCUAAGUCUtTsT	824	AGACUUAGCCGCAGUUGGGTsT	18%	2%
ND-10553	825	CCAAGCGAAACUUGGAGCUtTsT	826	AGCUCCAAGUUUCGUUGGTsT	16%	1%
ND-10554	827	GGGUACAGCAGGCAUGCATsT	828	UGCAUGCCUGCGUGUACCCtTsT	19%	2%
ND-10555	829	UGCACGGGUUUCUUGCCCATsT	830	UGGGCAGGAAACCCGUGCATsT	28%	2%
ND-10556	831	CUCCUCUAGCCUCAUACCCtTsT	832	GGGUUUGAGGCUAGAGGAGTsT	109%	8%
ND-10557	833	UCCUCUAGCCUCAUACCCGTsT	834	CGGGUAUGAGGCUAGAGGATsT	117%	7%
ND-10558	835	UCUAGCCUCAUACCCGUGCTsT	836	GCACGGGUUUGAGGCUAGATsT	128%	9%
ND-10559	837	UUCAUACCUCAUAGUCUtTsT	838	AGACAUGUAGAGGUUUGAATsT	52%	4%
ND-10560	839	UCUACAUGUCUCUUGAGATsT	840	UCUCAAGCAGACAUGUAGATsT	15%	2%
ND-10561	841	AUAUUUCUACAGCCUUGAAATsT	842	UUUCAGGCUAGGAAAUAUTsT	15%	2%

ND-10562	843	AACUCCUAUGCAUCCCUUAATsT	844	UAAGGGAUGCAUAGGAGUUTsT	14%	1%
ND-10563	845	GCAUCCCUUAGAACCUGCTsT	846	GCAGGGUUCUAAGGGAUGCTsT	20%	1%
ND-10564	847	UGAUCACUCGCGCUUCUCCTsT	848	GGAGAAGCGGAGUGAUCATsT	67%	7%
ND-10565	849	UGUAAGUGCCUUGCGGUCATsT	850	UGACCGCAAGGCACUUACATsT	17%	2%
ND-10566	851	CCUUGCGGUCAGGGACUGATsT	852	UCAGUCCCUAGCCGCAAGGTsT	14%	1%
ND-10567	853	AAUCUUGCCGUUUUAUGUATsT	854	UACAUAAACGGGCAAGAUUTsT	13%	2%
ND-10568	855	CCGUUUAUGUAUGCUCCAUTsT	856	AUGGAGCAUACAUAACCGGTsT	19%	6%
ND-10569	857	UGUAUGCUCCAUGUCUAGCTsT	858	GCUAGACAUGGAGCAUACATsT	87%	13%
ND-10570	859	CAUGUCUAGCCCAUCAUCCTsT	860	GGAUGAUGGGCUAGACAUGTsT	33%	4%
ND-10571	861	AGUAGGCAGGAGCUCAAUATsT	862	UAUUAGGCUCCUGCCUACUTsT	11%	1%
ND-10572	863	CCUACAGGUACCCGGAAAUTsT	864	AUUUCCGGUACCUAGGTsT	22%	3%
ND-10573	865	CCCGUCGAGCCCGUAGCGUTsT	866	ACGCUACGGGCUCCGACGGGTsT	23%	1%
ND-10574	867	GCGGUGAGGGAGUGGUACCTsT	868	GGUACCACUCCUCCACCCGCTsT	30%	1%
ND-10575	869	UUUAUGGCAGTUGCACCAAGTsT	870	CUUGGUGCAGUCCGCAUAATsT	77%	6%
ND-10576	871	CUAUAAGCUCCAGGUUGACTsT	872	GUCAACCUGGAGCUUAUAGTsT	11%	1%

ND-10577	873	UAUAAGCUC CAGGUUGACUTsT	874	AGUCAACCCUGGAGCUUAUATsT	42%	8%
ND-10578	875	AGGUUGACUUCUCCUCAGATsT	876	UCUGAGGAGAAGUCAACCCUTsT	13%	3%
ND-10579	877	CUGGGCUUUUACCAAGUTsT	878	ACUUUGGUAACAGCCCAGTsT	19%	6%
ND-10580	879	AACAUAUACACCCGUAACATsT	880	UGUUGACGGUGUAUUUGUUTsT	13%	1%
ND-10581	881	UGGUUAAGGCUUCAGGAAGTsT	882	CUUCCUGAGCCCUUACCCATsT	20%	3%
ND-10582	883	GGUAAGGGCU CAGGAAGUTsT	884	ACUUCUGAGCCCUUACCCCTsT	22%	3%
ND-10583	885	CACCCAACUGCGGCUAAGUTsT	886	ACUUAGCCCGCAGUUUGGGUGTsT	22%	10%
ND-10584	887	ACCCAACUGCGGCUAAGUCTsT	888	GACUUAGCCCGCAGUUGGGUTsT	22%	5%
ND-10585	889	CCAACUGCGGCUAAGUCUCTsT	890	GAGACUUAGCCCGCAGUUGGTsT	14%	2%
ND-10586	891	CUUGGAUCAGCCAAGCGAATsT	892	UUUGCUUGGCU GAUCCCAAGTsT	15%	1%
ND-10587	893	GCCAAGCGAAACUUGGAGCTsT	894	GCUCCAAGUUUCGUUGGCTsT	17%	2%
ND-10588	895	UCCUAAGAAACCCGUGAUATsT	896	UAUCAGCGGUUUUCUUAAGGATsT	11%	2%
ND-10589	897	GCAUGCACGGUUUCCUGCTsT	898	GCAGGAAACCCGUGCAUUCTsT	24%	8%
ND-10590	899	UGUUACUUAAGCCAUUCCCTsT	900	GGGAUUUGCCUUAAGUAAACATsT	48%	10%
ND-10591	901	CUAGGGCUAGAGCAGACCCCTsT	902	GGGUCUGCUCUAGCCCUAGTsT	58%	10%

ND-10592	903	CUCUAGCCUCAUACCCGUGTsT	904	CACGGGU AUGAGGCCUAGAGTsT	34%	5%
ND-10593	905	UUAGAACCCUGUCAGACATsT	906	UGUCUAGCAGGGUUCUAATsT	14%	1%
ND-10594	907	UGUGAACCCUUCUGCCACATsT	908	UGUGGCAGAAGCGUUCACATsT	15%	0%
ND-10595	909	AUUGAUCACUCCGCCUUCUTsT	910	AGAAGCGGAGUGAUCAAUTsT	43%	1%
ND-10596	911	UCACUCCGCCUUCUCCUGGTsT	912	CCAGGAGAAGCGCGGAGUGATsT	90%	5%
ND-10597	913	GCGGUCAGGGACUGAAUCUTsT	914	AGAUUCAGUCCUUGACCGTsT	11%	0%
ND-10598	915	GGUCAGGGACUGAAUCUUGTsT	916	CAAGAUUCAGUCCCCUGACCTsT	13%	1%
ND-10599	917	GUUGCUCCAUUCUAGCCTsT	918	GGCUAGACAUGGAGCAUACTsT	28%	3%
ND-10600	919	CCAUUCUAGCCCAUCAUCTsT	920	GAUGAUGGGCUAGACAUGGTsT	12%	1%
ND-10601	921	GAUCGAGUCCACCCGUCCTsT	922	GGAGCGGUGGAAUCUGAUCTsT	17%	1%
ND-10602	923	GGACUCUAGCCUCCACAGTsT	924	CUGUGGAGGCCUAGAGUCCTsT	41%	4%
ND-10603	925	UCACCACUCUGUGGCCGGTsT	926	CCGGCCACGAGAGUGGUGATsT	83%	3%
ND-10604	927	CAGCUUGCGGGACAACAAsT	928	GUUGUUGUCCCGCAAGCUGTsT	21%	1%
ND-10605	929	CAUCUUCUAUCCGGCCCTsT	930	GGCCCCGGGAUAGAGAUGTsT	26%	2%
ND-10606	931	AUAAGCUCCAGGUUGACUUTsT	932	AAGUCAACCUGGAGCUUAUTsT	15%	1%

ND-10607	933	CUGCUGUUACUCACGAUGTsT	934	CAUCGUGAGUAAACCAGCAGTsT	85%	8%
ND-10608	935	GAACAUIUACACCGUCAACTsT	936	GUUGACGGUGUAUUGUUCTsT	13%	1%
ND-10609	937	AUUACACCGUCAACAACAAATsT	938	UUUGUUGUACGGUGUAAAUTsT	12%	0%
ND-10610	939	CUGUGGUUCGGCUCUCCGGTsT	940	CCGAGGACCGGAACCACAGTsT	53%	2%
ND-10611	941	GAAGUGCCUUGGCUCCAGCTsT	942	GCUGGAGCCAAAGGCACUUCTsT	24%	3%
ND-10612	943	GAUCAGCCAAGCGAAACUUTsT	944	AAGUUUCGCUUGGCUGAUCTsT	12%	0%
ND-10613	945	AGAAACCGCUGAUAAACCAGTsT	946	CUGGUUAUCAGCGGUUUCUTsT	12%	1%
ND-10614	947	UGAUAAACCAGGACAAACATsT	948	UGUUUUGUCCUGGUUAUCAATsT	7%	1%
ND-10615	949	CACGCAGGCAUGCACGGGUTsT	950	ACCCGUGCAUGCCUCCGGUGTsT	12%	0%
ND-10616	951	GCUCUCCAGUAGCACAGAUTsT	952	AUCUGUGCUACUCCGAGAGCTsT	9%	1%
ND-10617	953	CAGACCCGGGUAAGUAAAGTsT	954	CUUUACUUAACCCGGGUCUGTsT	55%	3%
ND-10618	955	AGACCCGGGUAAGUAAAGTsT	956	CCUUUACUUAACCCGGGUCUTsT	72%	8%
ND-10619	957	AUCACUCCGCCUUCUCCUGTsT	958	CAGGAGAAGCGGGAGUGAUTsT	63%	6%
ND-10620	959	CACUCCGCCUUCUCCUGGTsT	960	CCCAGGAGAAGCGGGAGUGTsT	28%	1%
ND-10621	961	AACUAGACUGUAAAGUGCCUTsT	962	AGGCACUUAACAGUCUAGUUTsT	23%	1%

ND-10622	963	U AUGCUCCAUGUCUAGCCCTsT	964	GGGCUAGACAU GGAGCAUA T sT	98%	2%
ND-10623	965	CCCGAUGUAUGGAACUGCTsT	966	GCAGUUUCCAUACAUCGGGTsT	11%	1%
ND-10624	967	GUACUGCUACUAUAAGCUCTsT	968	GAGCUUAUAGUAGCAGUA CTsT	19%	1%
ND-10625	969	AGCGUGACCAGCUACCAGCTsT	970	GCUGGUAGCUGGUCCACGCUTsT	49%	2%
ND-10626	971	ACAAUUACACCGUCAACAATsT	972	UUGUUGACGGUGUAUUUGUTsT	8%	0%
ND-10627	973	AUGCUCCUCUGGGGGAGGTsT	974	CCUCCCCACAGAGGAGCAUTsT	76%	5%
ND-10628	975	AACAGUAGCUGAUGAAGCUTsT	976	AGCUUCAUCAGCUACUGUUTsT	22%	1%
ND-10629	977	CUGACUCCGAGGGCUAGGTsT	978	CCUAGCCUCCGGGAGUCAGT sT	34%	2%
ND-10630	979	GUGCAACCAGAACAAUUCGTsT	980	CGAUUUGUUUCUGGUUGCACTsT	10%	1%
ND-10631	981	UGCAACCAGAACAAUUCGGTsT	982	CCGAUUUGUUUCUGGUUGCATsT	48%	4%
ND-10632	983	CUUCAAGUACACACAGCATsT	984	UGCUGUGUGUACUUUGAAGTsT	20%	1%
ND-10633	985	CAGCGUGACCAGCUACCAGTsT	986	CUGGUAGCUGGUACACGCUGTsT	35%	1%
ND-10634	987	AGAACA AUUACACCGUCAATsT	988	UUGACGGUGUA AUUGUUCUTsT	14%	0%
ND-10635	989	GAUAACCAGGACAAACACTsT	990	GUGUUUUGUCCUUGGUUAUCTsT	11%	1%
ND-10636	991	ACAACCAAGGGUACACGCATsT	992	UGCGUGUACCCUUGGUUGUTsT	17%	1%

ND-10637	993	CCCAGCGACGGC UUAAGCCtTsT	994	GGCUUAAGCCGUCGCGGGtTsT	27%	2%
ND-10638	995	CUCCGAGGGCUAGGGCUAtTsT	996	UAGCCCUAGCCCUCCGGAGtTsT	23%	1%
ND-10639	997	UAGAACCCUGCUCAGACACTsT	998	GUGUCUGAGCAGGGUUCUAtTsT	35%	2%
ND-10640	999	CCUGGGCUGUUUCACCAAGtTsT	1000	CUUGGUGAAACAGCCOCAGGtTsT	14%	1%
ND-10641	1001	GGAUCAGCCAAGCGGAAACUtTsT	1002	AGUUUCGUUGGCUGAUCCtTsT	16%	3%
ND-10642	1003	AAGAAACCGCUGAUAAcCATsT	1004	UGGUUAUCAGCGGUUCUUtTsT	17%	1%
ND-10643	1005	ACCAAGGGUACAGCAGGcTtsT	1006	GCCUGCGUGUACCCUUGGUtTsT	37%	4%
ND-10644	1007	GUAGCACAGAUGUCUGCUcTtsT	1008	GAGCAGACAUCUGUGCUAcTtsT	13%	3%
ND-10645	1009	UUUCAUAACCUCUACAUGUCtTsT	1010	GACAUGUAGAGGUUAUGAAAtTsT	88%	8%
ND-10646	1011	CCAACCAUCUGCCAGAGAAtTsT	1012	UUUCUGGCAGAUUGGUUGGtTsT	16%	2%
ND-10647	1013	GUCAGGGACUGAAUUCUUGcTtsT	1014	GCAAGAUUCAGUCCCUGAcTtsT	16%	3%
ND-10648	1015	AGCAUGAUAAGGAGUGUGtTsT	1016	CACACUCCUUGAUC AUGCUtTsT	50%	7%
ND-10649	1017	GCAGCGUGAOCAGCUACcATsT	1018	UGGUJAGCUGGUACCGCUGcTtsT	40%	6%
ND-10650	1019	CAGCUCUCUGCUGGUUAcUtTsT	1020	AGUAACCAGCAGAGAGCUgTtsT	56%	5%
ND-10651	1021	GUUCGGCUCUCCUGGUUGtTsT	1022	CAACACCGAGGAGCCGAAcTtsT	68%	5%

ND-10652	1023	GCAGAUGCUCUUGGUGTsT	1024	CCACCAGAGCAUCUGTsT	26%	5%
ND-10653	1025	AGGAAGUUCUCCAAGAACTsT	1026	GUUCUUGGAGCAACUUCCTsT	18%	2%
ND-10654	1027	AAGCUUCUGCCACAUCUUTsT	1028	AAGAUGGGCAGAAAGCUUTsT	18%	1%
ND-10655	1029	CACCUGGCUGUUCACCATsT	1030	UGGUGAAACAGCCAGGUGTsT	17%	2%
ND-10656	1031	AAGCCAUGCAGCGGACCATsT	1032	UGGUACGCUGCAUUGGCUUTsT	27%	3%
ND-10657	1033	CGAGGGCUAGGGCUAGAGCTsT	1034	GCUCUAGCCCUAGCCUCCGTsT	30%	1%
ND-10658	1035	GGAAACCCUGGACAGACUUTsT	1036	AAGUCUGUCCAGGGUUUCCTsT	14%	1%
ND-10659	1037	GUAGCUAUGAAGCUGCCCTsT	1038	GGCAGCUUCAUCAGCUACTsT	19%	1%
ND-10660	1039	UCUUUUCCCUUGGAUCAGTsT	1040	CUGAUCCAAGGAAAGATsT	88%	4%
ND-10661	1041	CUCCAGUAGCACAGAUUCTsT	1042	GACAUCUGUCUACUGGAGTsT	10%	1%
ND-10662	1043	CCAAAUUGAUCACUCCGCTsT	1044	GCGGAGUGAUCAAUUUGTsT	25%	3%
ND-10663	1045	CAGACCACCUGGCUGUUUTsT	1046	AAACAGCCAGGUGGUCUGTsT	24%	2%
ND-10664	1047	CCUUCCCAACUAGACUGUTsT	1048	ACAGUCUAGUUGGAAAGGTsT	15%	2%
ND-10665	1049	CGCAGCCGUCCGACCUUGCTsT	1050	GCAGGUCGGCAGCCUGGCTsT	45%	2%
ND-10666	1051	UUCACACCAAGGCAGAUUTsT	1052	AUCUGCCUUUGGUGAGAAATsT	25%	2%

ND- 10667	1053	CACCACCAUCCACGGGCGCTsT	1054	GCGCCGUGGAUGGGUGCTsT	35%	3%	4%	Segunda evaluación Dosis única @ 50nM en H441; MV 16%	SD 2%
ND- 10668	1055	CCAUUACUUUUGAAGCGCTsT	1056	GCGUUCACAAAAGUAUGGTsT	19%				
ND- 10669	1057	CCAAGAACAGUAGCUAUGTsT	1058	CAUCAGCUACUGUUCUUGTsT	23%	4%			1%
ND- 10670	1059	AGGAGAGUUUCUCACACCTsT	1060	GGUGAGAAACCUCCUTsT	18%	3%			2%
ND- 10671	1061	AUCAUCCUGCUUGGAGCAAsT	1062	UUGCUCCAAGCAGGAUGAUTsT	33%	3%			2%
ND- 10672	1063	GCAUCACAGAGCAGCGCTsT	1064	AGCGUCUGCUCUGUGAUGCTsT	29%	2%			4%
ND- 10673	1065	AGGAGGUAGOCUCCACCCUTsT	1066	AGGGUGGAGCCUACCUCCTsT	63%	6%		61%	3%
ND- 10674	1067	ACAACCGCAUGAAGACGGCTsT	1068	GCCGUCUUAUGGGUUGUTsT	94%	2%			
ND- 10675	1069	GCAUGAAGACGGCCUUCUGTsT	1070	CAGAAGCCGUCUUAUGCTsT	20%	2%		18%	1%
ND- 10676	1071	GUCACGAUGGUCACCCUCCCTsT	1072	GGAGGGUGAACCAUCGUGACTsT	66%	5%		60%	4%
ND- 10677	1073	CCUGCUCAGACACCAUUAAsT	1074	UAUUGGUGUCUGAGCAGGTsT	15%	3%		18%	1%

ND-10678	1075	UCACGAUGGUCACCCUCCUtsT	1076	AGGAGGUGACCAUCGUGATsT	80%	6%	70%	4%
ND-10679	1077	UCAACCCUACAUCGGACAAtsT	1078	UUGUCOGAGUUGAGGUUGATsT	20%	3%	21%	1%
ND-10680	1079	UGACCAGCUACCAGCUUCTsT	1080	GAGAGCUGGUAGCUGGUCATsT	88%	22%	77%	5%
ND-10681	1081	GAUGGCCUUGGUGACAUCtsT	1082	GAUGUCACCGAGGGCCAUCtsT	88%	18%	60%	4%
ND-10682	1083	GCUUUGACAAGGAAUUCtsT	1084	GAAGUUCUUGUCAAAAGCTsT	19%	7%	14%	2%
ND-10683	1085	CGAUACTUGGUCUCCAGGCTsT	1086	GGCCUGGAGACCAGUUCGTsT	27%	5%	27%	2%
ND-10684	1087	UCUGGAUGUCUCCAUGCCtsT	1088	GGCAUGGAAGACAUCCAGATsT	92%	13%	89%	3%
ND-10685	1089	CAGGACCCUAGACCUCUGCTsT	1090	GCAGAGGUUCUAGGGUCCUGTsT	58%	14%		
ND-10686	1091	GACCCUAGACCUUCGACGCTsT	1092	GCUGCAGAGGUCUAGGGUUCTsT	27%	2%		
ND-10687	1093	ACCCUAGACCUCUGCAGCCTsT	1094	GGCUGCAGAGGUUCUAGGGUtsT	21%	1%		
ND-10688	1095	CAGCCCA CGGGGAGGAGTsT	1096	CCUCCUCCGCCUGGGUUGTsT	55%	4%		
ND-10689	1097	CUCUUCGAGUUCUUCGATsT	1098	UGCAGAAGAACUCGAAGAGTsT	13%	3%		
ND-10690	1099	UUGGCAUGAUGUACUUGGCATsT	1100	UGCCAGUACAUCAUGCCAAtsT	16%	2%		

ND-10691	1101	GGCAUGAUGUACUGGCAAUTsT	1102	AUUGCCAGUACAUCAUGCCtTsT	13%	1%
ND-10692	1103	UGUACUGGCAAUUCGGCCUTsT	1104	AGGCCGAUUGCCAGUACATsT	45%	2%
ND-10693	1105	ACUGGCAAUUCGGCCUGCUTsT	1106	AGCAGGCCGAAUUGOCAGUTsT	38%	3%
ND-10694	1107	GGCAAUUCGGCCUGCUUUUUsT	1108	AAAAGCAGGCCGAAUUGCCtTsT	10%	1%
ND-10695	1109	CAAUUCGGCCUGCUUUUCGtTsT	1110	CGAAAAGCAGGCCGAAUUGtTsT	12%	1%
ND-10696	1111	UCGGAGAGUACUUCAGCUATsT	1112	UAGCUGAAGUACUCUCCGATsT	12%	1%
ND-10697	1113	CAACAUCUGUCGAGGCGUgTsT	1114	CAGCCUCGACAGGAUGUUGtTsT	35%	7%
ND-10698	1115	CAUCCUGUCGAGGCGCCATsT	1116	UGGCAGCCUCCGACAGGAUGtTsT	26%	6%
ND-10699	1117	UCCUGCAACCAGGCCGAUUUsT	1118	AAUUCGCCUUGGUUGCAGGATsT	28%	6%
ND-10700	1119	GGAAACUGCUAUACUUUCATsT	1120	UGAAAGUAUAGCAGUUUCCTsT	7%	2%
ND-10701	1121	ACGGUCUGUCCUGAUGCUTsT	1122	AGCAUCAGGGCACAGACCgUTsT	28%	7%
ND-10702	1123	GGUCUGUCCUGAUGCUGCTsT	1124	GCAGCAUCAGGGACAGACCtTsT	33%	2%
ND-10703	1125	GGOCCGGGUAAUGGUGCACTsT	1126	GUGCACC AUUACCCGGGCCtTsT	47%	10%
ND-10704	1127	CAGGAUGAACCUUGCCUUUATsT	1128	UAAAGGCAGGUUCAUCCUGtTsT	59%	2%
ND-10705	1129	GAUGAACCUGCCUUUAUGGtTsT	1130	CCAUAAAGGCAGGUUCAUcTsT	77%	7%
ND-10706	1131	GGUGCUUUUAACUUGCGGCTsT	1132	GCCGCAAGUUAAGCCACCtTsT	47%	8%

ND-10707	1133	GUGGCUUUAACUUGCGCCTsT	1134	GGCCGCAAGUUAAAGCCACTsT	17%	2%
ND-10708	1135	UUGCGCCUGGCGUGGAGATsT	1136	UCUCCACGCCAGCCGCAATsT	52%	3%
ND-10709	1137	UGGGCCUGGCGUGGAGACTsT	1138	GUCUCCACGCCAGGCCGCATsT	81%	4%
ND-10710	1139	GCGGCCUGGCGUGGAGACCTsT	1140	GGUCUCCACGCCAGCCGCTsT	57%	4%
ND-10711	1141	CAGGUGUGUAUUCACUCCUtsT	1142	AGGAGUGAAUACACACCUGTsT	24%	2%
ND-10712	1143	GUGUAUUCACUCCUGCUtsT	1144	GAAGCAGGAGUGAAUACACTsT	20%	1%
ND-10713	1145	GGCCUCCUGGUGACAUCCTsT	1146	UGGGAUGUCACCCAGGGCCTsT	40%	3%
ND-10714	1147	GAUGCUAUCGCGACAGAACTsT	1148	GUUCUGUGCGGAUAGCAUtsT	24%	2%
ND-10715	1149	ACUACAATAACCAAUUCUGATsT	1150	UCAGAAUUGGUUUUGUAGUtsT	19%	2%
ND-10716	1151	CAAUUCUGAGUCUCCUCUtsT	1152	AGAGGGAGACUCAGAAUUGTsT	35%	3%
ND-10717	1153	CUCUGUCACGAUGGUCACCTsT	1154	GGUGAACCAUCGUGACAGAGTsT	41%	4%
ND-10718	1155	CUGCUCCGAAGGUUCCGAATsT	1156	UUCGGAAACCUUCGGAGCAGTsT	16%	3%
ND-10719	1157	AGGUUCCGAAGCCGAUACUtsT	1158	AGUAUCGGCUUCGGAAACCUtsT	16%	2%
ND-10720	1159	GUUCCGAAGCCGAUACUGGtsT	1160	CCAGUAUCGGCUUCGGAACtsT	21%	2%
ND-10721	1161	CGAAGCCGAUACUGGUCUtsT	1162	GAGACCAGUAUCGGCUUCGtsT	16%	1%
ND-10722	1163	AAGAUUGAAGGAUGUGCAGTsT	1164	CUGCACAUCUUAUUAUtsT	25%	2%

ND-10723	1165	GATUGAAGGAUGUGCAGGGTsT	1166	CCCUGCACAUCCUUCAUCTsT	26%	1%
ND-10724	1167	UGCCUCUGAACACACUCUGGUTsT	1168	ACCAGAGUGUUCAGAGGCATsT	45%	3%
ND-10725	1169	CCUCUGAACACACUCUGGUUTsT	1170	AAACCAGAGUGUUCAGAGGTsT	15%	2%
ND-10726	1171	GACAAGGAACUUCCUAAGTsT	1172	CUUAGGAAAGUUCCUUGUCTsT	105%	14%
ND-10727	1173	CAGGACAAAACACAAACCAATsT	1174	UUGGUUGUGUUUUGUCCUGTsT	32%	5%
ND-10728	1175	AACACAACCAAGGGUACACTsT	1176	GUGUACCCUUGGUUGUGUUTsT	60%	13%
ND-10729	1177	UUGAACUUUGGGUGGAAACTsT	1178	GUUCCACACCCOCCAGUUCAATsT	23%	8%
ND-10730	1179	UGAACUUUGGGUGGAAACCTsT	1180	GGUUUCCCAACCCAAAGUUCATsT	18%	4%
ND-10731	1181	ACCCUGCCUCACAGAGCTsT	1182	GCUCUGUGAGGGCACGGGUTsT	19%	1%
ND-10732	1183	ACUAUAACAUCUGCUGGAGTsT	1184	CUCCAGCAGAUUUUAUAGUTsT	17%	5%
ND-10733	1185	AUCUGCUGGAGUGUUGCUGTsT	1186	CAGCAACACUCCAGCAGAUTsT	119%	20%
ND-10734	1187	CUGCUGGAGUGUUGCUGUUTsT	1188	AACAGCAACACUCCAGCAGTsT	58%	13%
ND-10735	1189	CUAGCCCAUCAUCCUGCUUTsT	1190	AAGCAGGAUGAUGGGCUAGTsT	20%	6%
ND-10736	1191	CUCUGGAUGUCUCCAUUGCTsT	1192	GCAUGGAAGACAUCCAGAGTsT	28%	8%
ND-10737	1193	AGCAGGACCCUAGACCUCUTsT	1194	AGAGGUUCUAGGGUCCUGCUTsT	36%	2%

ND-10738	1195	UUUGAGUUCUUUCUGCAACATsT	1196	UGUUUGCAGAGAACUCGGAATsT	13%	1%
ND-10739	1197	CACCAUCCACGGCGCCAUCsT	1198	GAUGGGCGCGUGGAUGGUGTsT	13%	2%
ND-10740	1199	CCACGGCGCCAUCGCCUGTsT	1200	CAGGCGGAUGGCCGCGUGGTsT	44%	4%
ND-10741	1201	CAGCACACCGCAUGAAGATsT	1202	UCUUCAUCCGGUUGUGCUGTsT	23%	3%
ND-10742	1203	CCUUUGGCAUGAUGUACUGTsT	1204	CAGUACAUCAUCCCAAGGTsT	12%	1%
ND-10743	1205	AUCCUGUGGAGGCCUGCCAGTsT	1206	CUGGCAGCCUCGACAGGAUTsT	14%	3%
ND-10744	1207	UCUCCUGCAACCAGCGGAATsT	1208	UUCCGCUUGGUGCAGGAGATsT	12%	1%
ND-10745	1209	UGCAACCAGGGCGAAUUACUTsT	1210	AGUAAUUCCGCCUGGUUGCATsT	45%	5%
ND-10746	1211	ACCUCCAUCAGCAUGAGGATsT	1212	UCCUCAUGCUGAUGGAGGUTsT	82%	7%
ND-10747	1213	GCGACUGCACCAAGAAUGGTsT	1214	CCAUUCUUGGUGCAGUCGCTsT	82%	19%
ND-10748	1215	ACCAAGAUUGCCAGUGAUGTsT	1216	CAUCACUGCCAUUCUUGGUTsT	54%	18%
ND-10749	1217	UGGUUACUCACGAUGGCCCTsT	1218	GGCCAUJCGUGAGUAACCATsT	45%	7%
ND-10750	1219	AGAAUUGGAGUGGCCCAAAGTsT	1220	CUUUGCCACUCUCCAUUUUCUTsT	11%	3%
ND-10751	1221	GGAGCUGAACUACAAACCTsT	1222	GGUUUUGUAGUUCAGCUCCTsT	15%	3%
ND-10752	1223	CCUCUGUCACGAUGGUCACTsT	1224	GUGACCAUCCGUGACAGAGGTsT	18%	5%
ND-10753	1225	AGAUUGAAGGAUGUGCAGGTsT	1226	CCUGCACAUCCUCAAUCUTsT	26%	3%
ND-10754	1227	GAGCUUUGACAAGGAACUUTsT	1228	AAGUUCCUUUGUCAAAAGCUCTsT	14%	2%

ND-10755	1229	CUUUGACAAGGAACUUUCCTsT	1230	GGAAAGUCCUUGUCAAGTsT	50%	8%
ND-10756	1231	UCAGACACCAUUAUUUGTsT	1232	CAAAAGJAAUGGUGUCUGATsT	32%	4%
ND-10757	1233	AGCACACUAUAACAUCUGCTsT	1234	GCAGAUGUUUAJUGUGCUTsT	11%	2%
ND-10758	1235	GCACAACCGCAUGAAGAGCTsT	1236	CGUCUUCAUGCCGUUGUGCTsT	34%	3%
ND-10759	1237	ACUGCUUCUACCAGACAUAATsT	1238	UAUGUCUGGUAGAAGCAGUTsT	11%	1%
ND-10760	1239	GAAGACGGCCUUCUGGGCATsT	1240	UGCCCAGAAAGCCGUCUUCTsT	16%	2%
ND-10761	1241	AAGACGGCCUUCUGGGCAGTsT	1242	CUGCCCAGAAAGCCGUCUUTsT	58%	21%
ND-10762	1243	ACAUCAACCUCAACUCGGATsT	1244	UCCGAGUUGAGGUUGAUGUTsT	14%	3%
ND-10763	1245	UGGAAGGACUGGAAGAUCGTsT	1246	CGAUCUUCAGUCCUUCCTsT	109%	29%
ND-10764	1247	ACAUCCUGUCGAGGCGUCCTsT	1248	GGCAGCCUCGACAGGAUGUTsT	101%	13%
ND-10765	1249	CAACCAGCGGAUUUACUCUTsT	1250	AGAGUAAUUCGCCUGGUUGTsT	19%	5%
ND-10766	1251	CAGCGAAUUUACUUCACUTsT	1252	AGUGAGAGUAAUUCGCCUGTsT	24%	4%
ND-10767	1253	AGCAGAAUGACUUCAUUCCTsT	1254	GGAAUGAAGUCAUUCUGCUTsT	40%	8%
ND-10768	1255	AUGAUGGCGCUUUAACUUTsT	1256	AAGJUAAAGCCCAUCAUTsT	85%	8%
ND-10769	1257	AGAACCUUUAACCUUCAAAATsT	1258	UUUGAAGGGUAAAGGUUCUTsT	22%	4%
ND-10770	1259	CCUUUACCCUUCAAAGUACTsT	1260	GUACUUUGAAGGGUAAAGGTsT	21%	4%

ND-10771	1261	GAGCCUGUGGUUCGGCUOCTsT	1262	GGAGCCGAAcCACCAGGCUCTsT	28%	1%
ND-10772	1263	UGGUACUGCCUCUGAACACTsT	1264	GUGUUCAGAGCCAGUACCATsT	58%	4%
ND-10773	1265	CUCAUACCCGUGCCUCACTsT	1266	GUGAGGCACGGGUAGAGTsT	15%	2%
ND-10774	1267	CCGUAGCACACUAUAACAUTsT	1268	AUGUUAUAGUGUGCUACGGTsT	24%	6%
ND-10775	1269	CGUAGCACACUAUAACAUCTsT	1270	GAUGUUAUAGUGUGCUACGTsT	21%	4%
ND-10776	1271	GCAGGACCCUAGACCUCUGTsT	1272	CAGAGGUCUAGGGUCCUGTsT	25%	4%
ND-10777	1273	GCCUGCUUUUCGGAGAGUATsT	1274	UACUCUCCGAAAGCAGGCTsT	18%	4%
ND-10778	1275	GGCCCGGGUUAUGGUGCATsT	1276	UGCACCAUUACCCGGCCCTsT	16%	2%
ND-10779	1277	CAACAACAAGAGAAUGGATsT	1278	UCCAUUUCUUGUUGUUGTsT	17%	0%
ND-10780	1279	GCUGUUGCAcCAUACUUUCTsT	1280	GAAAGUAUGGUGCAACAGCTsT	14%	1%
ND-10781	1281	CUACCGAGAGCUUCUGGATsT	1282	CUcGAAAGAGCUCUCGGUAGTsT	24%	3%
ND-10782	1283	ACCUGCCUUUAUGGAUUAUTsT	1284	AUCAUCCAUAAAGGCAGGUTsT	115%	10%
ND-10783	1285	UUGACAAGGAACUUCCUAATsT	1286	UAGGAAAGUUCUUGUCAATsT	16%	1%
ND-10784	1287	GCUGGAGUGUUGCUUUGCTsT	1288	GCAACAGCAACACUCCAGCTsT	12%	1%
ND-10785	1289	UCGGUGACAUCcCAGGAUUTsT	1290	AUUCcUGGGUUGUCACCCGATsT	28%	1%
ND-10786	1291	GCUGCCcCAGAAUGGCCUUUGTsT	1292	CAAGGCACUUCUGGGCAGCTsT	15%	2%
ND-10787	1293	AGUACACACAGCAGGUGUGTsT	1294	CACACCUGCUUGUGUACUTsT	12%	1%
ND-10788	1295	CAAGUGCCGGAAAGCCAUUGCTsT	1296	GCAUGGCUUCCGGCACUUUGTsT	94%	2%

Tabla 1C: ARNsi(s) seleccionados en el conjunto de sustituto de rata *in vivo* (ARNsi(s) con reactividad cruzada de humano-rata con alta especificidad en rata). Se identificó, un conjunto de detección de 48 secuencias de ARNi de alfa-ENaC con reactividad cruzada de humano-rata. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección dosis-única independientes (consultar la sección de ejemplos para los métodos utilizados).

5

ID Dúplex	ID Seq	Sentido	ID Seq	Antisentido	Primera evaluación: dosis única @ 50nM en H441; %V	Segunda evaluación @ 50nM en H441	SD
ND-9201	1297	UGGCAACCAGAACAAAUC18T	1298	GAUUDGUUCUGGUUGCACAT8T	8%	8%	1%
ND-9202	1299	UUUAUGGAUGAUGGUGGU18T	1300	AGCCACCAUCCAUCAAAT8T	80%	82%	6%
ND-9203	1301	GCCUUUAUGGAUGAUGGUG18T	1302	CACCALUCAUC-AUAAAGGCT8T	76%	76%	2%
ND-9204	1303	CACAAACCAGUAAGACGGT8T	1304	CCGUUCUUC-AUGCGGUUGUT8T	73%	57%	3%
ND-9205	1305	ACCGCAUGAAGACGGCCUU18T	1306	AAGGCGUCUUC-AUGCGGU18T	35%	37%	2%
ND-9206	1307	AGGACUGGAAGACGGCCUU18T	1308	AAGCCGUAUCUUC-AAGUCCU18T	17%	16%	3%
ND-9207	1309	GAAGACUGGAAGACGGCC18T	1310	GCCGALUCUUC-AGUCCUUC18T	96%	81%	5%
ND-9208	1311	GGACUGGAAGACGGCCUUC18T	1312	GAGCCGUAUCUUC-AAGUCC18T	58%	57%	3%
ND-9209	1313	AGUCCACCAGUCCUACCCG18T	1314	CGGUAGGAGCGGUGGAAUC18T	85%	94%	4%
ND-9210	1315	GACUGGAAGACGGCCUUC18T	1316	GGAGCCGUAUCUUC-AAGUCC18T	79%	82%	2%
ND-9211	1317	CGCAUGAAGACGGCCUUC18T	1318	AGAGCCGUAUCUUC-AAGUCC18T	50%	51%	1%
ND-9212	1319	GCCAGUGGAAGACGGCCUUC18T	1320	AACCAGGCGUCCACUGGC18T	26%	23%	2%
ND-9213	1321	UGCCUUUAUGGAUGAUGG18T	1322	ACCAUCAUCAUAAAGGCA18T	77%	76%	4%
ND-9214	1323	UCUUGUCCAGACUUGCCAG18T	1324	CUCCCGAGGUUGGACAGGA18T	74%	83%	6%

ND-9215	1325	AGGAGUGGUACCGCUUCCUcTst	1326	GGAGGGUACcACUCCUcTst	79%	6%	89%	4%
ND-9216	1327	GGcUGGccUAcAUcUcUcTst	1328	AGAAGUAGUAGGcACAGCCTst	11%	1%	13%	1%
ND-9217	1329	GAuuuuAAGAGAGcUGGfTst	1330	CcAGCUCCUuuAAUuUcTst	84%	14%	78%	5%
ND-9218	1331	AcUGGAAGUcGGc-UmccATst	1332	UGGAAGCGAUcUCCAGUcTst	50%	4%	55%	3%
ND-9219	1333	CCUGccAAccUGGcAGcTst	1334	GCUGCCcAGGUUGGcAGGcTst	78%	6%	85%	5%
ND-9220	1335	CCUGccuuuAUgGAUGAUgTst	1336	CAUcAUcAAuAAAGGcAGGcTst	76%	5%	77%	9%
ND-9221	1337	AAccGcAUgAAAGcGGccUcTst	1338	AGCCCGUcUcAUcGGGUcTst	79%	8%	66%	3%
ND-9222	1339	UGccAAccUGGcAGccATst	1340	UGCCUGCCcAGGUUGGcATst	70%	4%	57%	4%
ND-9223	1341	GUccAAccUGGcAGccAGTst	1342	CUgGCUgCCcAGGUUGGACTst	95%	10%	76%	4%
ND-9224	1343	AAuuuuAAGAGAGcUGGATst	1344	UcAGCUCCUuuAAUuUcTst	83%	6%	69%	2%
ND-9225	1345	GGAGGcAUgGAAGUcGGfTst	1346	CCGAUcUcAGUcUCCUcTst	41%	2%	30%	2%
ND-9226	1347	GUgAGGAGUGGUAccGcUcTst	1348	AGCGGwAcAcUcCCUcAcTst	21%	1%	17%	0%
ND-9227	1349	AcuuuCAUGAcAAAGAAcATst	1350	UGUcUUGUcAUUGAAAGUcTst	13%	1%	10%	0%
ND-9228	1351	uCAUgAcAAAGAAcAAcUcTst	1352	GAGUUGUcUUGUcAUUGATst	36%	2%	28%	0%
ND-9229	1353	CUuuAUgGAUGAUgGUgGcTst	1354	GCcAcAUcAUcAAuAAAGTst	24%	1%	20%	1%
ND-9230	1355	GcUgGcUGGAGAcCUcCCTst	1356	GGAGGUcUcAcGcCAGGcTst				
ND-9231	1357	UGGcUGGAGAcCUcCAUcTst	1358	GAUGGAGUcUcCAcGcCAtst	45%	4%	35%	2%
ND-9232	1359	GAGUccAcGcUcCUAcCTst	1360	GGUAGGcGGUUGGAAcUcTst	89%	4%	86%	8%
ND-9233	1361	CAGAGcAAUGAcUcCAUcTst	1362	AUGAGUcAUcUGcUcUGTst	21%	1%	17%	0%
ND-9234	1363	UcAcUcUcUGcUcCAGGATst	1364	UCCUGGAGcAGGAGUGAAcTst	85%	4%	74%	6%
ND-9235	1365	UcAcUcUcUGcUcCAGGATst	1366	CUCCUGGAAcAGGAGUGATst				
ND-9236	1367	CUgUGcAAcGAGAAcAAUcTst	1368	AUUUGUcUUGGUUGcAcAGTst	23%	1%	17%	2%
ND-9237	1369	CUgCAcAAcAcCAcCAUcTst	1370	GAUGGUcGUUGUUGcAGTst	34%	2%	27%	2%
ND-9238	1371	UGUGGcUGUGcCUAcUcUcTst	1372	AGAUgAGGcAcAGCCAcATst	86%	4%	73%	10%
ND-9239	1373	UGGcUGUGcCUAcUcUcUcTst	1374	GAAGAUgAGGcAcAGCCAcTst	68%	6%	53%	4%
ND-9240	1375	CUgUcCAcCUgGcCAGcCTst	1376	GcUUGCCcAGGUUGGAcAGTst	80%	5%	73%	9%
ND-9241	1377	CCUgUcUGUcAcAGUGAcTst	1378	GUcAcUUGGAcAGcAGGcTst	83%	5%	71%	5%
ND-9242	1379	GcAGcAGUGGAGcCUgUGTst	1380	CcAGGcUcAcUUGcUcGcTst	105%	9%	90%	5%
ND-9243	1381	UUcAAUGAcAAGAAcAAcUcTst	1382	AGUUGUcUUGUcAUUGAAcTst	23%	3%	21%	1%
ND-9244	1383	CUgCCUUuAUGGAUGAUgGfTst	1384	CcAUcAUcAAuAAAGGcAGTst	74%	6%	64%	7%
ND-9245	1385	AAUGAcAAGAAcAAcUcCAcTst	1386	UGGAGUUGUcUUGUcAUUcTst	21%	1%	21%	1%
ND-9246	1387	UGGcAGcCAGUGGAGcCUcTst	1388	AGCCUcAcUUGGcUcCCAcTst	83%	3%	73%	2%
ND-9247	1389	CUccUGUcCAcCUgGcATst	1390	UGCCcAGGUUGGAcAGGAGTst	86%	3%	84%	1%
ND-9248	1391	GGcUGGAGAcCUcCAUcATst	1392	UGAUgGAGUcUcCAGCCcTst	92%	4%	88%	3%

Tabla 1D: ARNsi(s) seleccionados en el conjunto de sustituto de conejillo de indias *in vivo* (ARNsi(s) con reactividad cruzada de humano-conejillo de Indias). Un conjunto de detección de 63 secuencias de ARNi de alfa-ENaC con reactividad cruzada de humano- conejillo de Indias, se identificaron y sintetizaron, tanto con (cadenas de secuencia 1393-1518) y sin (cadenas 1519-1644) modificación de esqueleto. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección dosis-única independientes (consultar la sección de ejemplos para los métodos utilizados).

5

ID Duplex	ID Seq	Sentido	ID Seq	Antisentido	Primera Evaluación Dosis Única @ 50nM en H441; MV	Segunda Evaluación @ 50nM en H441
ND8437	1393	AUCCGACUCUUCUACCCAT	1394	UGGAGAGCAGUCCGATUT	48%	46%
ND8438	1395	AUCGGACUGCUUCUACCCAGT	1396	CUUGUAGAGCAGUCCGATUT	85%	93%
ND8439	1397	AAUUCGGACUGCUUCUACCCAT	1398	GGUAGAGCAGUCCGATUT	36%	42%
ND8440	1399	UCGGACUGCUUCUACCCAGT	1400	UCUUGGAGCAGUCCGATUT	45%	50%
ND8441	1401	ACCAGAACAAUUCGGACUGT	1402	CAGUCCGATUTGUCUGGUT	23%	24%
ND8442	1403	CCAGAACAAUUCGGACUGT	1404	GcAGUCCGATUTGUCUGGUT	50%	39%
ND8443	1405	CAGAACAAUUCGGACUGT	1406	AGCAGUCCGATUTGUCUGT	22%	24%
ND8444	1407	CUUCGCUUGCCGCUUCUACCCAT	1408	GUUGAAGCCGAGCCGACAT	111%	109%
ND8445	1409	UGGUAACCUGCUUCUACCCAT	1410	UGUAGUGGAGCCGUAACCAT	84%	97%
ND8446	1411	AUCUUCGCUUGCCGCUUCUACCCAT	1412	UGAAGCCGAGCCGUAACCAT	90%	121%
ND8447	1413	UUCGCUUGCCGCUUCUACCCAT	1414	GUUGAAGCCGAGCCGACAT	92%	105%
ND8448	1415	CACCCUACUUCUACCCAT	1416	CCUUGAAGCCGAGCCGACAT	79%	90%
ND8449	1417	AGAACAAUUCGGACUGCUUT	1418	AAGCAGUCCGATUTGUCUGT	11%	17%

ND8450	1419	GAACAANAucGGAcuGcuucTsT	1420	GAAGcAGUCCGAAUUUGUUCTsT	21%	1%	30%	5%
ND8451	1421	CGGAcuGcuucAcuAccAGAcTsT	1422	GUUCUGuAGAAcAGUCcCGTsT	24%	2%	32%	5%
ND8452	1423	AGccuAAcAucAAccuCATsT	1424	UGAGGUUGAUUGUAGGCUUtsT	51%	3%	57%	4%
ND8453	1425	GccuAAcAucAAccuCAATsT	1426	UUGAGGUUGAUUGUAGGCUUtsT	16%	1%	26%	3%
ND8454	1427	GucAGccuAcAucAAccTsT	1428	GGUUGAUUGUAGGCUUGACTsT	62%	5%	68%	6%
ND8455	1429	ucAGccuAcAucAAccuTsT	1430	AGGUUGAUUGUAGGCUUGACTsT	77%	4%	87%	6%
ND8456	1431	cAGccuAcAucAAccuTsT	1432	GAGGUUGAUUGUAGGCUUGTsT	34%	2%	51%	8%
ND8457	1433	GGAGcuGGAcGcuAcATsT	1434	UGUGAUUGGUCcAGCUCCTsT	26%	2%	17%	1%
ND8458	1435	GuAccGcuuAcAucAAcTsT	1436	GAUGuAGUGGAAGCGGuACTsT	101%	9%	99%	11%
ND8459	1437	ccGcuuAcAucAAcTsT	1438	GUUGAUUGuAGUGGAAGCGTsT	85%	8%	80%	6%
ND8460	1439	cGcuuAcAucAAcTsT	1440	UGUUGAUUGuAGUGGAAGCGTsT	56%	6%	48%	3%
ND8461	1441	uuccAucAucAAcTsT	1442	GGAUUGUUGuAGUGGAATsT	77%	5%	82%	7%
ND8462	1443	uGGcAAcuuAcuucGcTsT	1444	GCGAAGUUGAAUUGCCcATsT	21%	0%	36%	6%
ND8463	1445	GcAAcuuAcuucGccuGcTsT	1446	cAGSCGAAGAUAGAUGCUtsT	80%	4%	84%	13%
ND8464	1447	cAAcuuAcuucGccuGcTsT	1448	GcAGGCGAAGAUAGAUGUUGTsT	101%	1%	102%	14%
ND8465	1449	AAcuuAcuucGccuGccTsT	1450	GGcAGCCGAAGAUAGAUGUtsT	100%	4%	95%	12%
ND8466	1451	AcuuAcuucGccuGccTsT	1452	CGcAGCCGAAGAUAGAUGUtsT	51%	4%	49%	5%
ND8467	1453	cuuAcuucGccuGccTsT	1454	CGcAGCCGAAGAUAGAUGTsT	95%	5%	89%	4%
ND8468	1455	ucAuucGccuGccGcuuTsT	1456	AAcGGcAGCCGAAGAUAGTsT	91%	4%	85%	6%
ND8469	1457	cAuucGccuGccGcuuTsT	1458	GAAGCCcAGCCGAAGAUAGTsT	66%	4%	55%	4%
ND8470	1459	ucuuGccuGccGcuuCAATsT	1460	UUGAAGCCcAGCCGAAGATsT	97%	2%	99%	11%
ND8471	1461	cGccuGccGcuuAcCAGTsT	1462	CUUGUUGAAGCCcAGCCcTsT	96%	4%	100%	7%
ND8472	1463	GccuGccGcuuAcCAGTsT	1464	CCUGGUUGAAGCCcAGCCcTsT	90%	4%	82%	5%
ND8473	1465	AuuAcuucAcuucAcCATsT	1466	UGGUUGAUGAGAGUAAUtsT	81%	3%	72%	4%
ND8474	1467	uuAcuucAcuucAcCATsT	1468	GUGGUUGAUGAGAGUAAUtsT	72%	2%	76%	9%

ND8475	1469	AcucAcuuccAccAcccTst	1470	GGGUGGGAAGUGAGAGUTst	90%	3%	97%	4%
ND8476	1471	ucUGcAcCCucAAuCCcUATst	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	AcccUAAuCCcUAcAGGUtst	1478	ACCUGuAGGGAUUGAGGGUTst	55%	5%	48%	3%
ND8480	1479	cccUAAuCCcUAcAGGUATst	1480	uACCUGuAGGGAUUGAGGGTst	20%	1%	14%	1%
ND8481	1481	ccUcAAuCCcUAcAGGUAcTst	1482	GuACCUGuAGGGAUUGAGGGTst	40%	2%	31%	3%
ND8482	1483	AAccAGAAcAAuCCcUAcTst	1484	AGUCCGAUUUGUCCUGGUUTst	57%	2%	52%	0%
ND8483	1485	AAcAAuCCcUAcAGGUcUcTst	1486	AGAAGcAGUCCGAUUUGUUTst	102%	5%	86%	12%
ND8484	1487	AcAAuCCcUAcAGGUcUATst	1488	uAGAAcAGUCCGAUUUGUTst	40%	2%	28%	3%
ND8485	1489	cAAuCCcUAcAGGUcUAcTst	1490	GuAGAAGcAGUCCGAUUUGTst	41%	4%	38%	2%
ND8486	1491	GcAcccUcAAuCCcUAcAGTst	1492	CUGuAGGGAUUGAGGGUCCtst	91%	7%	94%	4%
ND8487	1493	ccUcAAcAAuCCcUAcTst	1494	GUUGAGGUUGAUUGAGGGTst	46%	2%	37%	3%
ND8488	1495	cUcAAcAAuCCcUAcTst	1496	AGUUGAGGUUGAUUGAGTst	48%	2%	39%	3%
ND8489	1497	uCAAcAAuCCcUAcTst	1498	GAGUUGAGGUUGAUUGAGTst	17%	1%	17%	1%
ND8490	1499	uAcCGcUuCCcUAcUAcUATst	1500	UGAUUGuAGUGGAAGCGGUATst	90%	5%	74%	8%
ND8491	1501	AcCGcUuCCcUAcUAcUATst	1502	UUGAUGuAGUGGAAGCGGUtst	103%	5%	91%	15%
ND8492	1503	GcUuCCcUAcUAcUAcUATst	1504	AUGUUGAUUGuAGUGGAAGCTst	85%	5%	71%	10%
ND8493	1505	cuUCCcUAcUAcUAcUATst	1506	GAUGUUGAUUGuAGUGGAAGTst	60%	5%	45%	3%
ND8494	1507	uccAcUAcUAcUAcUAcUATst	1508	AGGAUGUUGAUUGuAGUGGATst	33%	3%	41%	3%
ND8495	1509	ccAcUAcUAcUAcUAcUATst	1510	cAGGAUGUUGAUUGuAGUGGtst	60%	5%	55%	2%
ND8496	1511	cuGGcAAcUuCCcUAcUuCCGtst	1512	CGAAGAUUGAUUGGCCAGTst	18%	0%	20%	0%
ND8497	1513	GGcAAcUuCCcUAcUuCCGcUATst	1514	AGCCGAAGAUUGAUUGCCCTst	76%	1%	77%	2%
ND8498	1515	uuCAcUuCCcUAcUuCCGcUATst	1516	AGCCGcAGCCGAAGAUUGAATst	65%	4%	74%	12%
ND8499	1517	uCGCCUcGccUcUAcUAcUATst	1518	UGGUUGAAGCCGcAGCCGATst	86%	5%	77%	3%

ND-8653	1519	AAUCGGACUGCUUCUACCATsT	1520	UGGUAGAAGCAGUCCGAUUTsT	16%	2%	20%	3%
ND-8654	1521	AUCGGACUGCUUCUACCATsT	1522	CUGGUAGAACAGUCCGAUTsT	54%	8%	67%	11%
ND-8655	1523	AAUUCGGACUGCUUCUACCATsT	1524	GGUAGAAGCAGUCCGAUUTsT	25%	4%	28%	2%
ND-8656	1525	UCGGACUGCUUCUACCATsT	1526	UCUGGUAGAAGCAGUCCGATsT	12%	2%	17%	1%
ND-8657	1527	ACCAGAACAAUCCGACUGTsT	1528	CAGUCCGAUUUGUUCUGGUTsT	33%	3%	35%	1%
ND-8658	1529	CCAGAACAUAUCGGACUGTsT	1530	GCAGUCCGAUUUGUUCUGGUTsT	27%	3%	30%	2%
ND-8659	1531	CAGAACAAUCCGACUGTsT	1532	AGCAGUCGAAUUGUUCUGTsT	15%	1%	22%	3%
ND-8660	1533	CUUCGCCUGCCGCUUCAACTsT	1534	GUUGAAGCCGAGGCGAAGTsT	69%	17%	75%	10%
ND-8661	1535	UGGUACCGCUUCACUACATsT	1536	UGUAGUGGAAGCGGUACCATsT	16%	2%	20%	3%
ND-8662	1537	AUCUUCGCCUGCCGCUUCAACTsT	1538	UGAAGCCGAGGCGAAGTsT	19%	2%	25%	4%
ND-8663	1539	UUCGCCUGCCGCUUCAACTsT	1540	GGUUGAAGCGGCGAAGTsT	90%	4%	97%	10%
ND-8664	1541	CACCCUCAUCCCUACAGGTsT	1542	CCUGUAGGGAUUGAGGGUGTsT	19%	2%	25%	3%
ND-8665	1543	AGAACAAUCCGACUGTsT	1544	AAGCAGUCCGAUUUGUUCUTsT	13%	1%	22%	2%
ND-8666	1545	GAACAAUCCGACUGTsT	1546	GAAGCAGUCCGAUUUGUUCUTsT	11%	2%	18%	2%
ND-8667	1547	CGGACUGCUUCUACCATsT	1548	GUUCUGGAAGCAGUCCGATsT	13%	1%	16%	2%
ND-8668	1549	AGCCUCAACAUCUACATsT	1550	UGAGGUUGAUUGAGGCUUTsT	17%	4%	21%	3%
ND-8669	1551	GCCUCAACAUCUACATsT	1552	UUGAGGUUGAUUGAGGCUUTsT	13%	1%	21%	3%
ND-8670	1553	GUCAGCCUCAACAUCUACATsT	1554	GGUUGAUUGAGGCUUTsT	43%	11%	27%	3%
ND-8671	1555	UCAGCCUCAACAUCUACATsT	1556	AGGUUGAUUGAGGCUUTsT	90%	17%	53%	13%
ND-8672	1557	CAGCCUCAACAUCUACATsT	1558	GAGGUUGAUUGAGGCUUTsT	17%	3%	11%	3%
ND-8673	1559	GGAGCUGGACCGCAUCATsT	1560	UGUGAUGGGUCCAGCUUTsT	25%	3%	18%	3%
ND-8674	1561	GUACCGCUUCACUACATsT	1562	GAUGUAGUGGAAGCGGUACTsT	21%	4%	16%	4%
ND-8675	1563	CCGCUUCACUACAUCUACATsT	1564	GUUGAUGUAGUGGAAGCGGATsT	25%	4%	19%	3%
ND-8676	1565	CGCUUCACUACAUCUACATsT	1566	UGUUGAUGUAGUGGAAGCGGATsT	16%	3%	14%	1%
ND-8677	1567	UUCACUACAUCUACATsT	1568	GGAUGUUGAUGUAGUGGAAGTsT	110%	19%	97%	9%

ND-8678	1569	UGGCAACUUCUACUUCGCTsT	1570	GCGAAGAUGAAGUUGCCCATsT	50%	8%	40%	5%
ND-8679	1571	GCAACUUCUUCUCCUGTsT	1572	CAGCGAAGAUGAAGUUGCTsT	19%	3%	17%	2%
ND-8680	1573	CAACUUCUUCUUGCCUGCTsT	1574	GCAGGGAAGAUGAAGUUGTsT	25%	2%	23%	2%
ND-8681	1575	AACUUCUUCUUCGCCUGCTsT	1576	GCGAGCGGAAGAUGAAGUUTsT	104%	7%	85%	10%
ND-8682	1577	ACUUCUUCUUGCCUGCCGTsT	1578	CGGCAGCGGAAGAUGAAGUTsT	91%	8%	63%	9%
ND-8683	1579	CUUCAUCUUCGCCUGCCGTsT	1580	GCGGCAGCGGAAGAUGAAGTsT	88%	6%	58%	6%
ND-8684	1581	UCAUCUUCGCCUGCCUGTsT	1582	AAGCGCAGCGGAAGAUGATsT	76%	3%	64%	4%
ND-8685	1583	CAUCUUCGCCUGCCUGTsT	1584	GAAGCGCAGCGGAAGAUGTsT	15%	1%	18%	3%
ND-8686	1585	UCUUCGCCUGCCUGCCUAAATsT	1586	UUGAAGCGGCAGCGGAAGATsT	109%	22%	31%	3%
ND-8687	1587	CGCCUGCCUGCCUUAACCAGTsT	1588	CUGGUUGAAGCGGCAGCGGTsT	90%	21%	49%	2%
ND-8688	1589	GCCUGCCUGCCUUAACCAGTsT	1590	CCUGGUUGAAGCGGCAGCGTsT	43%	9%	24%	7%
ND-8689	1591	AUACUCUCACUCCACCATsT	1592	UGGUGGAAGUGAGAGUAATsT	27%	4%	19%	2%
ND-8690	1593	UUACUCUCACUCCACCATsT	1594	GUGGUGGAAGUGAGAGUAATsT	109%	7%	85%	8%
ND-8691	1595	ACUCUCACUCCACCACCTsT	1596	GGGUGGGAAGUGAGAGATsT	93%	11%	87%	12%
ND-8692	1597	UCUGCACCCUCAAUCCCUATsT	1598	UAGGGAUUGAGGGUCCAGATsT	31%	12%	17%	2%
ND-8693	1599	CUGCACCCUCAAUCCCUATsT	1600	GUAGGGAUUGAGGGUCCAGTsT	41%	25%	31%	4%
ND-8694	1601	UGCACCCUCAAUCCCUATsT	1602	UGUAGGGAUUGAGGGUCCAGTsT	75%	25%	43%	3%
ND-8695	1603	ACCCUCAAUCCCUACAGGUTsT	1604	ACCUGUAGGGAUUGAGGGUTsT	65%	26%	25%	5%
ND-8696	1605	CCCUCAAUCCCUACAGGUTsT	1606	UACCCUGUAGGGAUUGAGGGTsT	18%	2%	13%	1%
ND-8697	1607	CCUCAUCCCUACAGGUTsT	1608	GUACCCUGUAGGGAUUGAGGTsT	16%	4%	13%	2%
ND-8698	1609	AACCAGNACAAAUCGGACUTsT	1610	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUTsT	40%	2%	30%	2%
ND-8699	1611	AACAAUCCGACUGCUUCUTsT	1612	AGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	56%	4%	45%	3%
ND-8700	1613	ACAAUCCGACUGCUUCUATsT	1614	UAGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	18%	3%	12%	1%
ND-8701	1615	CAAAUCCGACUGCUUCUATsT	1616	GUAGAAGCAGUCCGAUUUGTsT	15%	2%	15%	4%
ND-8702	1617	GCACCCUCAAUCCCUACAGTsT	1618	CUGUAGGGAUUGAGGGUCCATsT	53%	4%	46%	20%

ND-8703	1619	CCUCAACAUCAACCUCACACTsT	1620	GUUGAGGUUGAUGUUGAGGTsT	25%	6%	26%	9%
ND-8704	1621	CUCAACAUAACAACCUCAACTsT	1622	AGUUGAGGUUGAUGUUGAGTsT	30%	8%	37%	26%
ND-8705	1623	UCAACAUCAACCUCACACTsT	1624	GAGUUGAGGUUGAUGUUGATsT	55%	1%	50%	10%
ND-8706	1625	UACCGCUCCACUACAUCATsT	1626	UGAUGUAGUGGAAGCGGUATsT	36%	7%	31%	7%
ND-8707	1627	ACCGUUCACUACAUCATsT	1628	UUGAUGUAGUGGAAGCGGUTsT	23%	5%	27%	10%
ND-8708	1629	GCUUCCACUACAUCACAUTsT	1630	AUGUUGAUGUAGUGGAAGCTsT	16%	4%	24%	12%
ND-8709	1631	CUUCCACUACAUCACACTsT	1632	GAUGUUGAUGUAGUGGAAGTsT	62%	3%	74%	27%
ND-8710	1633	UCCACUACAUCACAUCCUTsT	1634	AGGAUGUUGAUGUAGUGGATsT	45%	8%	41%	1%
ND-8711	1635	CCACUACAUCACAUCUCCUGTsT	1636	CAGGAUGUUGAUGUAGUGGTsT	23%	4%	27%	10%
ND-8712	1637	CUGGGCAACUACAUCUUCGTsT	1638	CGAAGAUAGAUGUUGCCAGTsT	34%	4%	26%	5%
ND-8713	1639	GGCAACUACAUCUUCGCCUTsT	1640	AGGCGAAGAUGAAGUUGCCTsT	30%	3%	23%	2%
ND-8714	1641	UUCAUCUUCGCCUUGCCGUTsT	1642	AGCGGCAGGCGGAAGAUAATsT	90%	14%	85%	14%
ND-8715	1643	UCGCCUGCGCUUCAACCATsT	1644	UGGUUGAAGCGGCAGGCGGATsT	23%	2%	20%	4%

ES 2 432 158 T3

Tabla 2A: Concentración a 50% de inhibición (IC50) para agentes de ARNi ejemplares de la Tabla 1A

ID Dúplex	IC50 [nM]	IC50 en [nM]
	1 ^{er} DRC en H441	2 ^{do} DRC en 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
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

ES 2 432 158 T3

Tabla 2B: Concentración al 50% de inhibición (IC50) y para agentes de ARNi ejemplares de la Tabla 1D

ID Dúplex	IC50 [nM]	IC50 en [nM]
	1 ^{er} DRC en H441	2 ^{do} DRC en H441
ND8441	0.6738	0.8080
ND8443	0.0346	0.0263
ND8449	0.0120	0.0067
ND8450	0.0257	0.0106
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 los ejemplares ARNi dirigidos hacia la inhibición de expresión del gen alfa-ENaC en los ensayos descritos en el Ejemplo 3

Identificador Dúplex	% de expresión de alfa-ENaC en HBEC primario (% de control) ARNsi 50nM	Expresión de alfa-ENaC cinomóloga (% de control) ARNsi 45nM
No transfectado	77.2	n/a
Control inespecífico	100	93.3
Control negativo (No-cino alfa-ENaC) 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. Una composición que comprende un agente ARNi que comprende una cadena codificante y una cadena no codificante, en donde:
- 5 a. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8357 (SEQ ID NO: 145), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8357 (SEQ ID NO: 146); o
- b. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8573 (SEQ ID NO: 449), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8573 (SEQ ID NO: 450); o
- 10 c. la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de ND8313 (SEQ ID NO: 57), y la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de ND8313 (SEQ ID NO: 58).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena no codificante tiene 30 o menos nucleótidos de longitud, y en donde la cadena codificante y la cadena no codificante forman una región dúplex de 15 a 30 pares de nucleótidos de longitud.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena no codificante y la cadena codificante tienen cada una 19 a 23 nucleótidos de longitud.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende una modificación que causa que el agente ARNi tenga un aumento de estabilidad en una muestra biológica.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende un fosforotioato o un nucleótido modificado en 2'.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende:
- 25 al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3'(5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'.
- 30 7. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende una modificación en 2' seleccionada del grupo que consiste de: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-amino-propilo (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. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende un extremo romo.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende un nucleótido protuberante que tiene de 1 a 4 nucleótidos no apareados.
- 35 10. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi comprende un nucleótido protuberante en el extremo 3' de la cadena no codificante del agente ARNi.
11. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi es ND8357 (SEQ ID NOs: 145 y 146).
12. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi es ND8573 (SEQ ID NOs: 449 y 450).
13. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi es ND8313 (SEQ ID NOs: 57 y 58).
- 40 14. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi se liga a uno o más compuestos de diagnóstico, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, fracciones que confieren resistencia a la nucleasa, nucleobase natural o inusual, molécula lipofílica, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol, vitamina, carbohidrato, dextrano, pululano, quitina, quitosano, carbohidrato sintético, Oligo Lactato 15-mer, polímero natural, polímero de peso molecular medio o bajo, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de enlace de proteína, molécula que dirige a la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, mimético de péptido, y/o transferrina.
- 45

15. Una composición que comprende un agente ARNi de alfa-ENaC, en donde el agente ARNi comprende una cadena codificante y una cadena no codificante,

5 en donde la cadena codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena codificante de un agente ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8357 (SEQ ID NO: 145), ND8573 (SEQ ID NO: 449) y ND8313 (SEQ ID NO: 57) y

en donde la cadena no codificante comprende al menos 19 nucleótidos contiguos a partir de la cadena no codificante de un agente ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8357 (SEQ ID NO: 146), ND8573 (SEQ ID NO: 450) y ND8313 (SEQ ID NO: 58),

la composición que además comprende un ligando de receptor epitelial.

10 **16.** La composición de la reivindicación 15, en donde el ligando de receptor epitelial es (i) la transferrina o (ii) el ácido fólico.

17. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 15, para uso en terapia.

15 **18.** La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 15, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad mediada por la disfunción del canal de sodio epitelial seleccionado de: fibrosis quística, disquinesia 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/o desequilibrio de electrolitos.

Figura 1

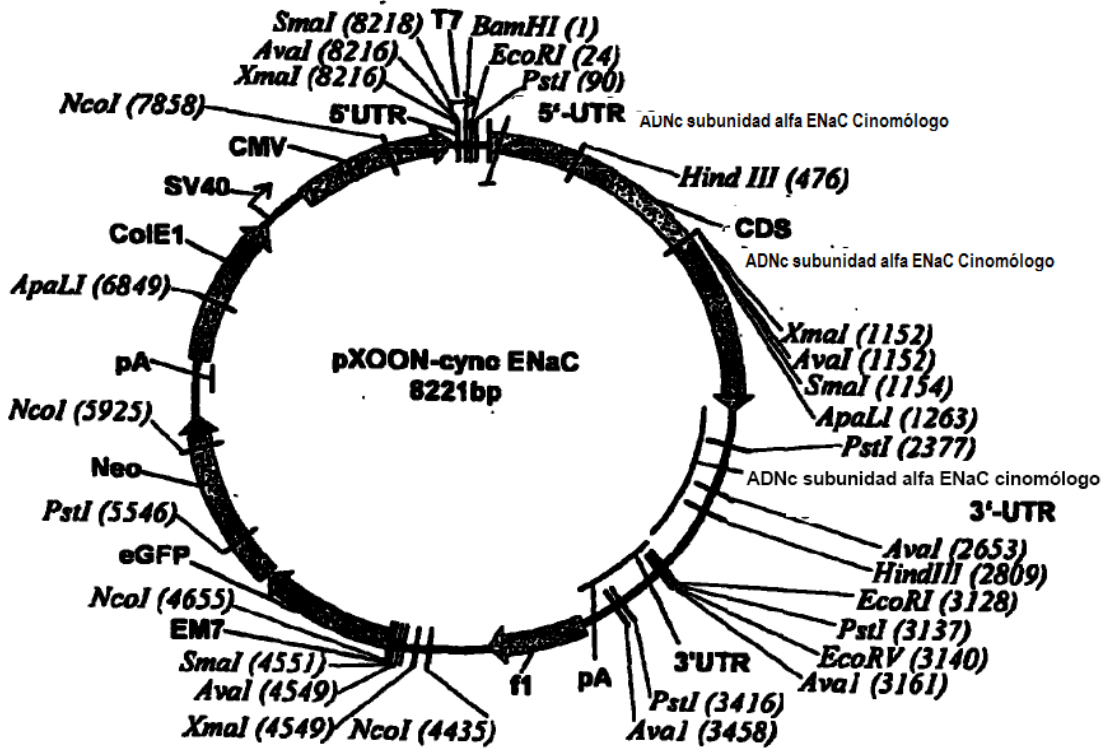


Figura 2

SEQ.I.D.NO:1682

GAATTCGCCCTTGGCCGCTGCACCTGTAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGA
 CCCTAGACCTCTGCAGCCCACCGCAGGGCTCATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCA
 GGACGCTAGCCCTCCACAGCCCACCCAGGGCTCATGAAGGGGGACAAGCGTGAGGA
 GCAGGGGCTGGGCCCAGAACCCTGCGGCACCCCAGCAGCCCACGGCGGAGGAGGAGGC
 CCTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAGTTCCTTCTGCAACAATAC
 CACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCCAGCACAACCGCATGAAGACGGC
 CTTCTGGGCAGTGTCTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTCGGCCT
 GCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCGGA
 CAAGCTTGTCTCCCCGAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTATCCGGA
 AATTAAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACACAGCAGACGCTCTTTGACCT
 GTACAAATACGACTCCTCCCCACCCTCGTGGCCGGCTCCC GCGGCCGTCGTGACCT
 GCGGGGCACTCTGCCGCACCTCTTGCAGCGCTGAGGGTCCCGTCCCCGCTTCACGG
 GGCCCGTCAAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCGTGC GGGACAACAACCCCAAGTGGA
 CTGGAAGGACTGGAAGATCGGTTTCGAGCTGTGCAACCAGAACAAATCAGACTGCTT
 CTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCAGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTA
 CATCAACATCCTGTTCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACACT
 GGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTA
 CTCTCACTTCCACCACCCAATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAA
 CTCTAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAGTCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCT
 GCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGT
 AATGGTGCACGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCG
 GCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAGCCCTGGACAGACTTGGGGG
 CGACTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTCCCTGTCAAGAACCTTTACCC
 TTCAAAGTACACGCAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAACATGATCAA
 GGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCGAGAACATGGAGTACTGTGA
 CTACAGGAAGCACAGTTCTTGGGGCTACTGCTACTATAAGCTCCAGGCTGACTTCTC
 CTCAGACCACCTGGGCTGTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGTGTGACCAGCTA
 CCAGCTCTCGGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTT
 CGAGATGCTATCGCGACAGAACAAC TACACCATCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGC
 CAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCCCTC
 TGTCACGATGGTCACCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGG
 CTCCTCAGTGCTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCATCTTTGACCTGCTGGTCAT
 CACATTCCTCCTGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGG
 GGACAGGGGTGCTCAGGAGGTGGCCTCCACCAGGCATCCTCCCCGCTTCCCACTT

CTGCCCCACCCACATCTCTGTACTTGTCCCAACTAGGCCCTGCTCCCTCCCCAGC
 CTTGACAGCCCCTCCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCTGCCATCTCCAGGGGG
 CTCGCGAGGGGCCAGCTCCACTGCCTATCCTCTGGGGGGGCCCTGAGAGAGGAGAGG
 TTCCTTGCACCAAGGCAGATGCTCCCCTGGTGGGAGGGTGCTGCCCTTGCCAAGATT
 GAAGGATGTGCAGGGCTTCCTCTCAGAGCCGCCAAACTGCCCTTGATGTGTGGAGG
 GGAAGCGAGATGGGTAAGGGGCTCAGGAAGTTGTTCCAAGAACAGTGGCCAATGAAG
 CTGCCCAGAAAGTGCCTTGGCTCTGGCTCTGTACCCCTTGGTACTGCCTCTGAACACT
 CTGGTTTCCCCACCCAAGTGCAGCTAAGTCTCCTTTTCCCCTTGGATCAGCCAAGCCA
 AACTTGGAGCTTTGACAAGGAACTTTCCTAAGAAATGGCTGATGACCAGGACAAAAC
 ACAACCAAGGGTACACACAGGCATGCACGCGTTTCCTGCCTGGCGACAGGTGAAGCC
 AGCCCCTGACTGACCTGGCCACACTGCTCTCCAGTAACACAGATGTCTGCCCCCTCAT
 CTTGAACTTGGGTGGGAAACCCACCCAAAAGCCCCCTTTATTACTTAGGCAATTCC
 CCTTCCCTGACTCCCAGAGCCAGGGCCAGAGCAGACCCGTATAAGTAAAGGCAGCT
 CCAGGGCTCCTCTAGGCTCATAACCCGTGCCCTCACAGAGCCATGCTCCAGCGCTTCT
 GTCCTGTGTCTTTCGTCCCTCTACATGTCTGCTCAAGACATTTTCTCAGCCTGAAAG
 CTTCCCCAGCCATCTGCCGGAGAACTCCTATGCATCCCTCAGAACCCTGCTCAGACA
 CCATFACTTTTGTGAAGGCTTCTGCCACATCTTGTGTCGCCAAAAATGATCACTCC
 CCTTCTGGTGGGCTCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTGCTGTTGCA
 CCATACTTTCTTGTACGTTTGTGTCTGCCTCCCCAACTGGACTGTGAGGGCCTTGTG
 GCCAGGGACTGAGTCTTGCCCGTTTATGTATGCTCCGTGTCTAGCCCATCATCCTGC
 TTGAAGCAAGTAGGCAGATGCTCAAAGGGCGAATTCTGCAGATATC

Traducción:

SEQ. I. D. NO: 1681

MEGNKLEEQDASPPQPTPGLMKGDKREEQGLGPEPAAPQQPTAE E E E A L I E F H
 RSYRELFEFFCNNTTIHGAI 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 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 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 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

