

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 532**

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 10163502 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2223695**

54 Título: **Inhibición de ARNi de la expresión 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:

04.12.2013

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 2 432 532 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 de ARNi de la expresión alfa-ENaC

5 Campo Técnico

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

Antecedentes

La interferencia de ARN o "ARNi" es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación que el ARN de cadena doble (dsARN) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire et al., Nature 391: 806-811, 1998). El dsARN corto dirige la inactivación post-transcripcional, específica de genes en muchos organismos, que incluyen vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función del gen. Esta tecnología se ha revisado numerosas veces recientemente, véase, por ejemplo Novina, C.D., y Sharp, P., Nature 2004, 430:161, y Sandy, P., et al., Biotechniques 2005, 39:215.

Las superficies mucosales en la interfaz entre el ambiente y el cuerpo han convertido una serie de mecanismos protectores. Una forma principal de dicha defensa innata es limpiar estas superficies con líquido. Normalmente, la cantidad de la capa líquida sobre una superficie mucosal refleja el balance entre la secreción líquida epitelial, que refleja frecuentemente la secreción de aniones (Cl^- y/o HCO_3^-) acoplada con agua (y un contra-ión de cationes), y la absorción de líquido epitelial, que refleja frecuentemente la absorción de Na^+ , acoplada con agua y contra aniones (Cl^- y/o HCO_3^-). Muchas enfermedades de las superficies mucosales están provocadas por muy poco líquido protector en aquellas superficies mucosales creadas por un desequilibrio entre la secreción (muy poca) y absorción (relativamente mucha). Los procesos de transporte de sal defectuosos que caracterizan estas disfunciones mucosales residen en la capa epitelial de la superficie mucosal. Un método para reponer la capa líquida protectora sobre las superficies mucosales es "re-balancear" el sistema al bloquear la absorción del líquido mediada por canales de Na^+ . La proteína epitelial que media la etapa de limitar el índice de Na^+ y la absorción del líquido es el canal epitelial Na^+ (ENaC). Se posiciona alfa-ENaC en la superficie apical del epitelio, es decir la interfaz ambiental de la superficie mucosal. La inhibición de la absorción del líquido mediada por Na^+ mediada por alfa-ENaC puede lograr utilidad terapéutica. Por lo tanto, subsiste una necesidad para el desarrollo de terapias efectivas para el tratamiento y prevención de enfermedades o trastornos en los que están implicados alfa-ENaC, por ejemplo fibrosis quística en humanos y animales, y particularmente para terapias con alta eficiencia. Un requisito para alta eficiencia es que el ingrediente activo no se degrade muy rápidamente en un ambiente fisiológico.

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

Resumen

En un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de iARN que comprende una cadena sentido y una cadena anti-sentido, en donde:

40 a. la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8496 (SEQ ID NO: 1511), y la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de ND8496 (SEQ ID NO: 1512); o

45 b. la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8712 (SEQ ID NO: 1637), y la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de ND8712 (SEQ ID NO: 1638).

En un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de iARN a alfa-ENaC, en donde el agente iARN comprende una cadena sentido y una cadena anti-sentido, en donde la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de un agente de iARN seleccionado del grupo que consiste de ND8496 (SEQ ID NO: 1511) y ND8712 (SEQ ID NO: 1637), y en donde la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de un agente de iARN

seleccionado del grupo que consiste de ND8496 (SEQ ID NO:1512) y ND8712 (SEQ ID NO: 1638), la composición comprende adicionalmente un ligando de receptor epitelial.

En un tercer aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende un agente de iARN, como se describió aquí anteriormente, para uso en terapia.

- 5 Las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones de agente iARN se pueden utilizar con cualquier dosificación y/o formulación descrita aquí, así como también con cualquier ruta de administración descrita aquí.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se establecen en los dibujos que acompañan y la descripción delante. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de esta descripción, los dibujos, y de las reivindicaciones.

- 10 En las Figuras:

Figura 1: Mapa de digestión de restricción de la construcción pXoon para macaco de java α -EnaC clonado.

Figura 2: La secuencia de ADN y proteínas del macaco de java alfa-EnaC.

- 15 Figura 3: Clonación de los sitios de reconocimiento en el objetivo y fuera del objetivo predichos en la construcción de luciferasa dual AY535007. Los fragmentos consisten de 19nt del sitio objetivo predicho y 10 nt de la secuencia de flanqueo en los extremos 5' y 3'.

Descripción Detallada

- 20 Para facilidad de exposición el término "nucleótido" o "ribonucleótido" se utiliza algunas veces en referencia a una o más subunidades monoméricas de un agente de ARN. Se entenderá que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido" aquí, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, también se puede referir a un nucleótido modificado, o la unidad estructural de reemplazo sustituta, como se describe adicionalmente adelante, en una o más posiciones.

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

- 30 Un "agente de iARN" (abreviatura para "agente ARN de interferencia") como se utiliza aquí, es un agente de ARN, que puede regular por disminución la expresión de un gen objetivo, *por ejemplo gen* ENaC SCNN1A. Aunque no esté limitado por la teoría, un agente de iARN puede actuar mediante uno o más de una serie de mecanismos, que incluyen división post-transcripcional de un mRNA objetivo algunas veces denominado en la técnica como ARNi, o mecanismos pre-transcripcionales o pre-traduccionales.

- 35 Un "agente de iARN ds" (abreviatura para "agente de iARN de cadena doble"), como se utiliza aquí, es un agente de iARN que incluye más de una, y preferiblemente dos, cadenas en las que la hibridación intercadena puede formar una región de estructura de dúplex. Una "cadena" se refiere aquí a una secuencia contigua de nucleótidos (que incluyen nucleótidos que ocurren en forma no natural o modificados). Las dos o más cadenas pueden estar, o cada una forma parte de, moléculas separadas, o se pueden interconectar covalentemente, *por ejemplo*, por un ligador, *por ejemplo*, un ligador de polietilenglicol, para formar una molécula. Por lo menos una cadena puede incluir una región que es suficientemente complementaria a un ARN objetivo. Dicha cadena se denomina la "cadena anti-sentido." Una segunda cadena del agente de dsARN, que comprende una región complementaria a la cadena anti-sentido, se denomina la "cadena sentido." Sin embargo, un agente de iARN ds también se puede formar de una molécula de ARN única que es por lo menos parcialmente auto-complementaria, que forma, *por ejemplo*, una estructura de horquilla o de ojal, que incluyen una región dúplex. La última se denomina aquí como ARN de horquilla corta o shARN. En dicho caso, el término "cadena" se refiere a una de las regiones de la molécula de ARN que es complementaria a otra región de la misma molécula de ARN.
- 45

- Aunque, en células de mamífero, los agentes de iARN ds largos pueden inducir la respuesta de interferón que es frecuentemente perjudicial, el agente de iARN ds corto no activa la respuesta de interferón, por lo menos no a un grado que sea perjudicial para la célula y/o anfitrión (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., RNA 10:1934, 2004; Heidel et al., Nature Biotechnol. 22 1579). Los agentes de iARN incluyen moléculas que son suficientemente cortas que no activan una
- 50

respuesta de interferón no específica perjudicial en células de mamífero normales. Sin embargo, la administración de una composición que incluye un agente de iARN (*por ejemplo*, formulado como se describe aquí) a un sujeto se puede utilizar para reducir la expresión de alfa-ENaC en el sujeto, mientras elude la respuesta de interferón. Las moléculas que son suficientemente cortas que no activan una respuesta de interferón perjudicial se denominan agentes de iARN o siARN aquí. Los "agentes de iARN" o "siARN" como se utiliza aquí, se refieren a un agente de iARN, *por ejemplo*, un agente de iARN ds, que es suficientemente corto que no induce una respuesta de interferón perjudicial en un mamífero, y particularmente una célula de humano, *por ejemplo*, tiene una región de dúplex de menos de 60 pero preferiblemente menos de 50, 40, o 30 pares de nucleótidos.

Los agentes de iARN aislados descritos aquí, que incluyen agentes de iARN ds y agentes de iARN, pueden mediar la expresión reducida de alfa-ENaC, *por ejemplo*, mediante degradación de ARN. Para conveniencia, dicho ARN también se denomina como ARN que se va inactivar. Dicho ácido nucleico también se denomina como "ARN objetivo", algunas veces "molécula de ARN objetivo" o algunas veces "gen objetivo".

Como se utiliza aquí, la frase "media ARNi" se refiere a la capacidad de un agente para inactivar, en una forma específica de secuencia, un gen objetivo. "Inactivar un gen objetivo" significa el proceso por el que una célula que contiene y/o expresa un cierto producto del gen objetivo cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o expresará por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % menos de dicho producto de gen cuando se pone en contacto con el agente, cuando se compara con una célula similar que no se ha puesto en contacto con el agente. Dicho producto del gen objetivo, *por ejemplo*, puede ser un ARN mensajero (mARN), una proteína, o un elemento regulador.

Como se utiliza aquí, el término "complementario" se utiliza para indicar un grado suficiente de complementariedad de tal manera que ocurre unión estable y específica entre una molécula de ARN objetivo compuesta, *por ejemplo*, mARN alfa-ENaC. La unión específica requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico para las secuencias no objetivo bajo condiciones en las que se desea unión específica, *es decir*, 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 que se realizan los ensayos. Las secuencias no objetivo difieren normalmente de las secuencias objetivo en por lo menos 2, 3 o 4 nucleótidos.

Como se utiliza aquí, un agente de iARN es "suficientemente complementario" a un ARN objetivo, *por ejemplo*, un mARN objetivo (*por ejemplo*, mARN alfa-ENaC) si el agente iARN reduce la producción de una proteína codificada por el ARN objetivo en una célula. El agente iARN también puede ser "exactamente complementario" al ARN objetivo, *por ejemplo*, el ARN objetivo y el agente iARN hibrida, preferiblemente para formar un híbrido hecho exclusivamente de pares base Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un agente de iARN "suficientemente complementario" puede incluir una región interna (*por ejemplo*, de por lo menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria a un ARN alfa-ENaC objetivo. Más aún, en algunas realizaciones, el agente iARN discrimina específicamente una diferencia de nucleótido único. En este caso, el agente iARN solo media ARNi si se encuentra complementariedad exacta en la región (*por ejemplo*, dentro de 7 nucleótidos de) la diferencia de nucleótido único. Los agentes de iARN preferidos se basarán en o consistirán de o comprenderán las secuencias sentido y antisentido proporcionadas en las Tablas 1A-1D.

Como se utiliza aquí, "esencialmente idéntico" cuando se utiliza se denomina a una primera secuencia de nucleótidos en comparación con una segunda secuencia de nucleótidos significa que la primera secuencia de nucleótidos es idéntica a la segunda secuencia de nucleótidos excepto para hasta uno, dos o tres sustituciones de nucleótidos (*por ejemplo*, adenosina reemplazada por uracilo). "Que retiene esencialmente la capacidad de inhibir la expresión alfa-ENaC en células humanas cultivadas," como se utiliza aquí se denomina un agente de iARN no idéntico a pero derivado de uno de los agentes de iARN de las Tablas 1A-1D mediante eliminación, adición o sustitución de nucleótidos, significa que el agente de iARN derivado posee una actividad inhibidora no menor de 20 % de la actividad inhibidora del agente iARN de las Tablas 1A-1D de la que se deriva. *Por ejemplo*, un agente de iARN derivado de un agente de iARN de las Tablas 1A-1D que disminuye la cantidad de mARN alfa-ENaC se presentan en células humanas cultivadas al 70 % lo que puede disminuir en sí mismo la cantidad de mARN presente en células humanas cultivadas mediante por lo menos 50 % con el fin de ser considerado que retiene esencialmente la capacidad de inhibir la replicación de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Opcionalmente, un agente de iARN puede disminuir la cantidad de mARN alfa-ENaC presente en células humanas cultivadas en por lo menos 50 %.

Como se utiliza aquí, un "sujeto" se refiere a un organismo de mamífero que experimenta tratamiento de un trastorno mediado por alfa-ENaC. El sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como una vaca, caballo, ratón, rata, perro, cerdo, cabra, o un primate. En la realización preferida, el sujeto es un humano.

55 Diseño y Selección de agentes de iARN

Como se utiliza aquí, "trastornos asociados con expresión alfa-ENaC" se refiere a cualquier estado biológico o patológico que (1) está mediado por lo menos en parte por la presencia de alfa-ENaC y (2) cuyo resultado se puede

efectuar al reducir el nivel del alfa-ENaC presente. Los trastornos específicos asociados con expresión alfa-ENaC se indican adelante.

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

Un agente de iARN se puede diseñar racionalmente con base en información de secuencia y características deseadas. Por ejemplo, un agente de iARN se puede diseñar de acuerdo con la temperatura de fusión relativa del dúplex candidato. De manera general, el dúplex tendría una temperatura de fusión inferior en el extremo 5' de la cadena anti-sentido que en el extremo 3' de la cadena anti-sentido.

La presente descripción proporciona composiciones que contienen siARN y/o shARN dirigidos a uno o más transcritos alfa-ENaC.

Para cualquier objetivo de gen particular que se seleccione, el diseño de los siARN o shARN para uso de acuerdo con la presente descripción seguirá preferiblemente ciertas directrices. También, en muchos casos, el agente que se suministra a una célula de acuerdo con la presente descripción puede experimentar una o más etapas de procesamiento antes de llegar a ser un agente supresor activo (véase adelante para discusión adicional); en dichos casos, aquellas personas medianamente versadas en la técnica apreciarán que el agente relevante se diseñará preferiblemente para incluir secuencias que pueden ser necesarias para su procesamiento.

Las enfermedades mediadas por disfunción epitelial del canal de sodio, incluyen enfermedades asociadas con la regulación de volúmenes de fluido a través de las membranas epiteliales. Por ejemplo, el volumen de líquido de la superficie de las vías respiratorias es un regulador clave para depuración mucociliar y el mantenimiento de la salud de los pulmones. El bloqueo epitelial del canal de sodio promoverá la acumulación de fluidos en el lado mucosal del epitelio de las vías respiratorias promoviendo por lo tanto la depuración de moco y evitando la acumulación de moco y esputo en tejidos respiratorios (que incluyen vías respiratorias del pulmón). Dichas enfermedades incluyen enfermedades respiratorias, tal como fibrosis quística, disquinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, infecciones del tubo respiratorio (agudas y crónicas; víricas y bacterianas) y carcinoma de pulmón. Enfermedades mediadas por bloqueo epitelial del canal de sodio también incluyen enfermedades diferentes a enfermedades respiratorias que se asocian con regulación anormal de fluidos a través del epitelio, implicando quizás la fisiología anormal de los líquidos de superficie protectores en su superficie, por ejemplo, xerostomía (boca seca) o queratoconjuntivitis sicca (ojos secos). Adicionalmente, el bloqueo epitelial del canal de sodio en el riñón se puede utilizar para promover diuresis e inducir por lo tanto un efecto hipotensivo.

El tratamiento puede ser sintomático o profiláctico.

El asma incluye asma intrínseca (no alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma severa, asma bronquítica, asma inducida por ejercicio, asma ocupacional y asma inducida luego de infección bacteriana. El tratamiento de asma también se entiende que abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 o 5 años de edad, que exhiben síntomas de respiración sibilante y diagnósticos o diagnosticables como "lactantes sibilantes", una categoría establecida de paciente de preocupación médica importante y ahora frecuentemente identificado como asmáticos incipientes o de fase temprana. (Para conveniencia esta afección asmática particular se denomina como "síndrome de lactante sibilante".)

La eficacia profiláctica en el tratamiento de asma se evidenciará por frecuencia reducida o severidad de ataque sintomático, por ejemplo, de ataque broncoconstrictor o asmático agudo, que mejora la función del pulmón o mejora la hiper-reactividad de las vías respiratorias. Se puede evidenciar adicionalmente mediante requerimiento reducido por otro, terapia sintomática, es decir, terapia para o que pretende restringir o abortar el ataque sintomático cuando ocurre, por ejemplo, anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides) o broncodilatador. El beneficio profiláctico en asma puede, en particular, ser evidente en sujetos propensos a "depresión matutina". La "depresión matutina" es un síndrome asmático reconocido, común para un porcentaje sustancial de asmáticos y caracterizado por ataque de asma, por ejemplo, entre las horas de aproximadamente 4-6 am, es decir, en un periodo normalmente sustancialmente distante de cualquier terapia de asma sintomática administrada previamente.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluye bronquitis crónica o disnea asociada con esta, enfisema, así como también exacerbación de hiper-reactividad de las vías respiratorias posterior a otra terapia de fármaco, en particular, otra terapia de fármaco inhalada. La descripción también es aplicable al tratamiento de bronquitis de cualquier tipo o género que incluye, por ejemplo, bronquitis aguda, araquídica, catarral, croupus, crónica o fitinoide.

Con base en los resultados mostrados aquí, la presente descripción proporciona agentes de iARN que reducen la expresión de alfa-ENaC en células cultivadas y en un sujeto, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un humano. Las

Tablas 1A-1D proporcionan agentes de iARN de ejemplo que dirigen alfa-ENaC, con base en abreviaturas de nomenclatura estándar dadas en la Tabla A.

La Tabla 1A, Seq Id No.s 305-608, Tabla 1B y Tabla 1D, Seq Id No.s 1519-1644 enumera los siARN que no comprenden modificaciones de nucleótidos excepto para un enlace fosforotioato entre el terminal 3' y las penúltimas timidinas. Las Seq Ids restantes en las Tablas 1A-1D enumeran los siARN en donde todos los nucleótidos que comprenden bases pirimidina son nucleótidos modificados 2'-Ometil en la cadena sentido, y todas las uridinas en un contexto de secuencia de 5'-ua-3' así como también todas las citidinas en un contexto de secuencia de o 5'-ca-3' son nucleótidos modificados 2'-O-metilo en la cadena anti-sentido.

Con base en estos resultados, la descripción proporciona específicamente un agente de iARN que incluye una cadena sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias de la cadena sentido de los agentes proporcionados en las Tablas 1A-1D, y una cadena anti-sentido que tiene por lo menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias anti-sentido de los agentes proporcionados en las Tablas 1A-1D.

Los agentes iARN mostrados en las Tablas 1A-1D están compuestos de dos cadenas de 19 nucleótidos de longitud que son complementarias o idénticas a la secuencia objetivo, más una saliente 3'-TT. La presente descripción proporciona agentes que comprenden por lo menos 15, o por lo menos 16, 17, o 18, o 19 nucleótidos contiguos de estas secuencias. Sin embargo, mientras que estas longitudes pueden ser potencialmente óptimas, no significa que los agentes de iARN se limiten a estas longitudes. El experto está consciente que los agentes de iARN más cortos o más largos pueden ser de forma similar efectivos, en razón a que, dentro de ciertos rangos de longitud, la eficacia es más bien una función de la secuencia de nucleótidos que la longitud de la cadena. Por ejemplo, Yang, et al., PNAS 99:9942-9947 (2002), demuestra eficacias similares para los agentes de iARN de longitudes entre 21 y 30 pares base. Otros han mostrado inactivación efectiva de genes mediante agentes de iARN hasta una longitud de aproximadamente 15 pares base (Byrom, et al., "Inducing RNAi with siRNA Cocktails Generated by RNase III" *Tech Notes* 10(1), Ambion, Inc., Austina, TX).

Por lo tanto, es posible y se contempla seleccionar las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A-1D una secuencia parcial de entre 15 a 19 nucleótidos para la generación de un agente de iARN derivado de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A-1D. Alternativamente, uno puede agregar 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, en tal una forma que los nucleótidos agregados son complementarios a la secuencia respectiva del gen objetivo, *por ejemplo*, alfa-ENaC. Por ejemplo, los primeros 15 nucleótidos de uno de los agentes se pueden combinar con los 8 nucleótidos encontrados 5' a esta secuencia en mRNA alfa-ENaC para obtener un agente con 23 nucleótidos en la cadena sentido y anti-sentido. Todos dichos agentes de iARN derivados se incluyen en los agentes iARN, proporcionados que retienen esencialmente la capacidad de inhibir la replicación alfa- ENaC en células humanas cultivadas.

La cadena anti-sentido de un agente de iARN debe ser igual a o por lo 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 tienen 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La cadena sentido de un agente de iARN debe ser igual a o por lo menos 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40, o 50 nucleótidos de longitud. Debe ser igual a o menor 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 de cadena doble de un agente de iARN debe ser igual a o por lo 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 tienen 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud.

De manera general, los agentes iARN incluyen una región de suficiente complementariedad al mRNA alfa-ENaC, y son de suficiente longitud en términos de nucleótidos, que el agente iARN, o un fragmento del mismo, pueden mediar la regulación por disminución del gen alfa-ENaC. No es necesario que haya complementariedad perfecta entre el agente iARN y el gen objetivo, pero la correspondencia puede ser suficiente para permitir que el agente iARN, o un producto de división del mismo, dirija la inactivación específica de secuencia, *por ejemplo*, mediante división de ARNi de un mRNA alfa-ENaC.

Por lo tanto, los agentes de iARN incluyen agentes que comprenden una cadena sentido y cadena anti-sentido cada una comprende una secuencia de por lo menos 16, 17 o 18 nucleótidos que es esencialmente idéntica, como se define adelante, una de las secuencias de las Tablas 1A-1D, excepto que no más de 1, 2 o 3 nucleótidos por cadena, respectivamente, se han sustituido por otros nucleótidos (*por ejemplo* adenosina reemplazada por uracilo), mientras que retiene esencialmente la capacidad de inhibir la expresión alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Estos agentes por lo tanto poseerán por lo menos 15 nucleótidos idénticos a una de las secuencias de las Tablas

1A-1D, pero se introducen 1, 2 o 3 emparejamientos incorrectos base con respecto a la secuencia alfa-ENaC objetivo o entre la cadena sentido y anti-sentido. Los emparejamientos incorrectos para la secuencia de ARN alfa-ENaC objetivo, particularmente en la cadena anti-sentido, son más tolerados en las regiones terminales y si están presentes están preferiblemente en una región o regiones terminales, *por ejemplo*, dentro de 6, 5, 4, o 3 nucleótidos de un terminal 5' y/o 3', más preferiblemente dentro de 6, 5, 4, o 3 nucleótidos del terminal 5' de la cadena sentido o el terminal 3' de la cadena anti-sentido. La cadena sentido solo necesita ser suficientemente complementaria con la cadena anti-sentido para mantener el carácter de cadena doble general de la molécula.

Se prefiere que las cadenas sentido y anti-sentido sean seleccionadas de tal manera que el agente iARN incluya una región no apareada o de cadena sencilla en uno o ambos extremos de la molécula. Sin embargo, un agente de iARN contiene las cadenas sentido y anti-sentido, preferiblemente pareadas por contener una saliente, *por ejemplo*, una o dos salientes 5' o 3' pero preferiblemente una saliente 3' de 2-3 nucleótidos. La mayoría de realizaciones tendrá una saliente 3'. Los agentes de iARN preferidas tendrán salientes de cadena sencilla, preferiblemente salientes 3', de 1 a 4, o preferiblemente 2 o 3 nucleótidos, de longitud, en uno o ambos extremos del agente iARN. Las salientes pueden ser el resultado de una cadena mayor que la otra, o el resultado de dos cadenas de la misma longitud que está en forma de etapas. Los nucleótidos no apareados que forman la saliente pueden ser ribonucleótidos, o pueden ser desoxiribonucleótidos, preferiblemente timidina. Los extremos 5' preferiblemente se fosforilan, o pueden ser no fosforilados.

Las longitudes preferidas para la región dúplex tienen entre 15 y 30, más preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, y 23 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, en el rango de agentes de iARN discutido anteriormente. Los agentes de iARN pueden asemejarse en longitud y estructura a los productos procesados naturales Dicer de dsARN largos. También se incluyen las realizaciones en las que las dos cadenas de los agentes de iARN se ligan, *por ejemplo*, se ligan covalentemente. Las estructuras de horquilla, u otras estructuras de cadena sencilla que proporcionan la región de cadena doble requerida, y preferiblemente una saliente 3' también están dentro de la descripción.

Evaluación de Agentes de iARN Candidatos

Como se indicó anteriormente, la presente descripción proporciona un sistema para identificar los siARN que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Debido a esto, como se indicó anteriormente, los shARN se procesan intracelularmente para producir los siARN que tienen porciones dúplex con la misma secuencia que la estructura de tallo del shARN, el sistema es igualmente útil para identificar los shARN que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Para propósitos de descripción esta sección se referirá a los siARN, pero el sistema también abarca los shARN correspondientes. Específicamente, la presente descripción demuestra la preparación exitosa de los siARN dirigidos para inhibir la actividad de alfa-ENaC. Las técnicas y reactivos descritos aquí se pueden aplicar fácilmente para diseñar nuevos siARN potenciales, dirigidos a otros genes o regiones de gen, y probados para su actividad en la inhibición la alfa- ENaC como se discute aquí.

En diversas realizaciones se pueden probar los inhibidores alfa-ENaC potenciales para la supresión de la expresión endógena de alfa- ENaC al introducir los siARN candidatos en células (por ejemplo, mediante la administración exógena o al introducir un vector o construcción que dirige la síntesis endógena de siARN en la célula), o en animales de laboratorio mediante administración pulmonar o nasal. Alternativamente, se pueden probar inhibidores alfa-ENaC potenciales *in vitro* mediante co-transfección transitoria de los siARN candidatos junto con un plásmido de expresión alfa-ENaC. Luego se evalúa la capacidad del siARN candidato para reducir los niveles de transcrito objetivo y/o para inhibir o suprimir uno o más aspectos o características de actividad alfa-ENaC tal como diferencia potencial epitelial o la absorción de fluidos de la superficie de las vías respiratorias.

Las células o animales de laboratorio a las que se ha suministrado composiciones de siARN de la invención (células/animales de prueba) se pueden comparar con células similares o comparables o animales de laboratorio que no han recibido la composición de la invención (células/animales de control, por ejemplo, célula/animales que no han recibido siARN o un siARN de control tal como un siARN objetivo para un transcrito no endógeno tal como proteína fluorescente verde (GFP)). El fenotipo de transporte de iones de las células/animales de prueba se puede comparar con el fenotipo de células/animales de control, dado que el siARN de la invención comparte la reactividad cruzada de la secuencia con el tipo de célula/especie de prueba. La producción de la proteína alfa-ENaC y la corriente de circuito corto (*in vitro* o *ex vivo*) se puede comparar en las células/animales de prueba con relación a las células/animales de control. Otros indicios de actividad alfa- ENaC, que incluyen diferencia potencial epitelial *ex vivo* o depuración mucociliar *in vivo* o formación de imágenes magnética de cuerpo completo (MRI), se puede comparar de forma similar. De manera general, las células/animales de prueba y las células/animales de control serían de la misma especie y, para células, del tipo de célula similar o idéntico. Por ejemplo, se pueden comparar células de la misma estirpe celular. Cuando la célula de prueba es una célula primaria, normalmente la célula de control también sería una célula primaria.

Por ejemplo, la capacidad de un siARN candidato para inhibir la actividad de alfa-ENaC se puede determinar convenientemente al (i) suministrar el siARN candidato a las células (ii) evaluar los niveles de expresión de mRNA alfa-ENaC con relación a un gen de control endógenamente expresado (iii) comparar la corriente sensible amiloide

en un modelo de célula *in vitro* producido en la presencia del siARN con la cantidad producida en la ausencia del siARN. Este último ensayo se puede utilizar para probar los siARN que dirigen cualquier transcripto objetivo que pueden influenciar la actividad alfa-ENaC indirectamente y no se limita a los siARN que dirigen los transcriptos que codifican las subunidades de canal ENaC.

- 5 La capacidad de un siARN candidato para reducir el nivel del transcripto objetivo se pueden evaluar al medir la cantidad del transcripto objetivo utilizando, por ejemplo, Northern blot, ensayos de protección de nucleasa, hibridación de sonda, transcripción inversa (RT)-PCR, RT-PCR en tiempo real, análisis de micromatriz, etc. La capacidad de un siARN candidato para inhibir la producción de un polipéptido codificado por un transcripto objetivo (en el nivel transcripcional o post-transcripcional) se puede medir utilizando una variedad de métodos basados en anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a, Western blot, inmunoensayos, ELISA, citometría de flujo, micromatrices de proteína, etc. En general, se puede utilizar cualquier método para medir la cantidad de transcripto objetivo o un polipéptido codificado por el transcripto objetivo.

- 15 En general, ciertos inhibidores de alfa-ENaC iARN preferidos reducen el nivel de transcripto objetivo por lo menos aproximadamente 2 veces, preferiblemente por lo menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 16 veces, por lo menos aproximadamente 64 veces o a un grupo incluso mayor con relación al nivel que estaría presente en la ausencia del inhibidor (por ejemplo, en una célula de control comparable que carece del inhibidor). En general, ciertos inhibidores alfa-ENaC iARN preferidos inhiben la actividad del canal ENaC, de tal manera que la actividad es menor en una célula que contiene el inhibidor que en una célula de control que no contiene el inhibidor mediante por lo menos 20 aproximadamente 2 veces, preferiblemente por lo menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 8 veces, por lo menos aproximadamente 16 veces, por lo menos aproximadamente 64 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces, por lo menos aproximadamente 200 veces, o a un grado incluso mayor.

- 25 Ciertos inhibidores alfa-ENaC iARN preferidos inhiben la actividad de canal ENaC durante por lo menos 12 horas, por lo menos 24 horas, por lo menos 36 horas, por lo menos 48 horas, por lo menos 60 horas, por lo menos 72 horas, por lo menos 96 horas, por lo menos 120 horas, por lo menos 144 horas o por lo menos 168 horas luego de la administración del siARN e infección de las células. Ciertos inhibidores alfa-ENaC preferidos evitan (es decir, reducen los niveles no detectables) o reducen significativamente la actividad alfa-ENaC durante por lo menos 24 horas, por lo menos 36 horas, por lo menos 48 horas, o por lo menos 60 horas luego de la administración del siARN.
- 30 De acuerdo con diversas realizaciones una reducción significativa en la actividad de alfa-ENaC es una reducción a menos de aproximadamente 90 % del nivel que ocurriría en la ausencia del siARN, una reducción de menos de aproximadamente 75 % del nivel que ocurriría en la ausencia del siARN, una reducción de menos de aproximadamente 50 % del nivel que ocurriría en la ausencia del siARN, una reducción de menos de aproximadamente 25 % del nivel que ocurriría en la ausencia del siARN, o una reducción de menos de 35 aproximadamente 10 % del nivel que ocurriría en la ausencia del siARN. La reducción en la actividad de alfa-ENaC se puede medir utilizando cualquier método adecuado que incluye, pero no se limita a, medición de corriente del circuito corto de sensibilidad amiloide e *in vitro*, la diferencia potencial epitelial *ex vivo* o *in vivo* de depuración mucociliar o MRI de cuerpo/pulmón completo.

Prueba de estabilidad, modificación, y nuevo ensayo de agentes de iARN

- 40 Se puede evaluar un agente de iARN candidato con respecto a la estabilidad, *por ejemplo*, su susceptibilidad a la división mediante una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando el agente iARN se introduce en el cuerpo de un sujeto. Se pueden emplear métodos para identificar sitios que son susceptibles a modificación, particularmente división, *por ejemplo*, división mediante un componente encontrado en el cuerpo de un sujeto. Dichos métodos puede incluir el aislamiento e identificación de fragmentos más abundantes formados mediante degradación del agente de iARN candidato después de su incubación con medio biológico aislado *in vitro*, por ejemplo suero, plasma, esputo, fluido cerebroespinal, o célula o homogenatos de tejido, o después de poner en contacto un sujeto con el agente de iARN candidato *in vivo*, identificando por lo tanto sitios propensos a división. Dichos métodos están, por ejemplo, sin limitación, en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO2005115481, presentada en Mayo 27, 2005.

- 50 Cuando se identifican sitios susceptibles a división, se puede diseñar un agente de iARN adicional y/o sintetizar en donde el sitio de división potencial se hace resistente a división, *por ejemplo* mediante la introducción de una modificación 2' en el sitio de división, *por ejemplo* un grupo 2'-O-metilo. Este agente de iARN adicional se puede volver a probar para estabilidad, y este proceso se puede reiterar hasta que se encuentra que un agente de iARN exhibe la estabilidad deseada.

- 55 Prueba *In Vivo*

Un agente de iARN identificado como que es capaz de inhibir la expresión génica alfa-ENaC se puede probar para funcionalidad *in vivo* en un modelo de animal (*por ejemplo*, en un mamífero, tal como en ratón, rata, conejillo de

indias o primate). Por ejemplo, el agente de iARN se puede administrar a un animal, y el agente iARN evaluado con respecto a su biodistribución, estabilidad, y su estabilidad para inhibir la expresión alfa-ENaC o modular un proceso patológico o biológico mediado por lo menos en parte por alfa-ENaC.

5 El agente iARN se puede administrar directamente al tejido objetivo, tal como mediante inyección, o el agente iARN se puede administrar al modelo de animal de la misma forma que se administraría a un humano. Preferiblemente, el agente iARN se suministra las vías respiratorias del sujeto, tal como mediante administración intranasal, inhalada o intratraqueal.

10 El agente iARN también se puede evaluar para su distribución intracelular. La evaluación puede incluir determinar si el agente iARN se toma en la célula. La evaluación también puede incluir determinar la estabilidad (*por ejemplo*, la vida útil) del agente iARN. Se puede facilitar la evaluación de un agente de iARN *in vivo* mediante el uso de un agente de iARN conjugado con un marcador trazable (*por ejemplo*, un marcador fluorescente tal como fluoresceína; una etiqueta radioactiva, tal como ³⁵S, ³²P, ³³P, o ³H; partículas de oro; o partículas de antígeno para inmunohistoquímica).

15 El agente iARN se puede evaluar con respecto a su capacidad de regular por disminución la expresión de alfa-ENaC. Los niveles de expresión génica alfa-ENaC *in vivo* se pueden medir, por ejemplo, mediante hibridación *in situ*, o mediante el aislamiento de ARN del tejido antes de y luego de exposición al agente iARN. Cuando el animal necesita ser sacrificado con el fin de cosechar el tejido, un animal de control no tratado servirá para comparación. Se puede detectar el ARN alfa-ENaC mediante cualquier método deseado, que incluye pero no se limita a RT-PCR, northern blot, ensayo de ADN ramificado, o ensayo de protección de ARNasa. Alternativamente, o adicionalmente, la expresión génica alfa-ENaC se puede supervisar al realizar análisis western blot o inmunotinción en extractos de tejido tratados con el agente iARN.

20

25 Se pueden probar inhibidores alfa-ENaC potenciales utilizando cualquier variedad de modelos de animal que se han desarrollado. Las composiciones que comprenden los siARN candidatos, construcciones o vectores capaces de dirigir la síntesis de dichos siARN dentro de una célula anfitriona, o células construidas por ingeniería o manipuladas para contener los siARN candidatos se pueden administrar a un animal. Se evalúa la capacidad de la composición para suprimir la expresión alfa-ENaC y/o para modificar los fenotipos dependientes de ENaC y/o disminuir su severidad con relación a animales que no reciben el inhibidor alfa-ENaC potencial. Dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, modelos de murino, rata, conejillo de indias, oveja y primate diferente a humano para fenotipos dependientes de ENaC, todos los cuales se conocen en la técnica y se utilizan para probar la eficacia de los terapéuticos potenciales alfa-ENaC.

30

Utilizando los sistemas inventados para identificar los agentes de iARN terapéuticos candidatos, los agentes terapéuticos adecuados se seleccionan de identificadores Dúplex ND-8302, ND-8332, ND-8348, ND-8356, ND-8357, ND-8373, ND-8381, ND-8396, ND-8450 y ND-8453, se selecciona más adecuadamente de ND-8356, ND-8357 y ND-8396.

35 Química de iARN

Se describen aquí agentes de iARN aislada, *por ejemplo*, agentes de ARN ds RNA que median ARNi para inhibir la expresión del gen alfa-ENaC.

40 Los agentes de ARN discutidos aquí incluyen ARN no modificado de otra forma así como también ARN que se ha modificado, *por ejemplo*, para mejorar la eficacia, y polímeros de sustituto de nucleósidos. El ARN no modificado se refiere a una molécula en la que los componentes de ácido nucleico, a saber azúcares, bases, y unidades estructurales de fosfato, son iguales o esencialmente iguales a lo que ocurre en la naturaleza, preferiblemente cuando ocurren en forma natural en el cuerpo humano. La técnica se denomina rara o inusual, pero ocurren en forma natural, los ARN como ARN modificados, véase, *por ejemplo*, Limbach et al. Nucleic Acids Res. 22: 2183-2196, 1994. Dichos ARN raros o inusuales, frecuentemente denominados ARN modificados (evidentemente debido a que son normalmente el resultado de una modificación post-transcripcional) están dentro del término ARN no modificado, como se utiliza aquí. El ARN modificado como se utiliza aquí se refiere a una molécula en la que uno o más de los componentes de ácido nucleico, a saber azúcares, bases, y unidades estructurales de fosfato, son diferentes de las que ocurren en la naturaleza, preferiblemente diferentes de lo que ocurre en el cuerpo humano. Aunque no se denominen como "ARN," modificados estos por supuesto, debido a la modificación, incluirán moléculas que no son ARN. Los sustitutos de nucleósido son moléculas en las que la estructura principal de ribofosfato se reemplaza con una construcción de no ribofosfato permitiendo a las bases presentadas en relación espacial correcta tal como hibridación sean sustancialmente similares a aquella vista con una estructura principal de ribofosfato, *por ejemplo*, imitadores no cargados de la estructura principal de ribofosfato. Ejemplos de lo anterior se discuten aquí.

50

Las modificaciones descritas aquí se pueden incorporar cualquier ARN de cadena doble y molécula similar a ARN descrita aquí, *por ejemplo*, un agente de iARN. Puede ser deseable modificar una o ambas cadenas sentido y anti-sentido de un agente de iARN. Los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas adelante ocurren en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, *por ejemplo*, una modificación de una base, o una unidad estructural de fosfato, o el oxígeno no ligador de una unidad estructural de fosfato. En algunos casos la modificación ocurrirá en todas las posiciones del sujeto en el ácido nucleico pero en muchos, y de hecho en la mayoría, de los casos no ocurrirá. Por vía de ejemplo, solo puede ocurrir una modificación en una posición terminal 3' o 5', solo puede ocurrir en una región terminal, *por ejemplo* en una posición de nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena. Puede ocurrir una modificación en una región de cadena doble, una región de cadena sencilla, o en ambos. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición O no ligadora solo puede ocurrir en uno o ambos terminales, solo puede ocurrir en regiones terminales, *por ejemplo*, en una posición en el nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones de cadena doble y de cadena sencilla, particularmente en el terminal. De forma similar, puede ocurrir una modificación en la cadena sentido, cadena anti-sentido, o ambas. En algunos casos, la cadena sentido y anti-sentido tendrá las mismas modificaciones o la misma clase de modificaciones, pero en otros casos la cadena sentido y anti-sentido tendrá diferentes modificaciones, *por ejemplo*, en algunos casos puede ser deseable modificar solo una cadena, *por ejemplo* la cadena sentido.

Dos objetivos primarios para la introducción de las modificaciones en los agente de iARN es su estabilización hacia la degradación en ambientes biológicos y la mejora de propiedades farmacológicas, *por ejemplo* propiedades farmacodinámicas, que se discuten adicionalmente adelante. Otras modificaciones adecuadas para un azúcar, base, o estructura principal de un agente de iARN se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/01193, presentada en Enero 16, 2004. Un agente de iARN puede incluir una base que no ocurre en forma natural, tal como las bases descritas en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/011822, presentada en Abril 16, 2004. Un agente de iARN puede incluir un azúcar que no ocurre en forma natural, tal como una molécula de portador cíclica sin carbohidrato. Las características de ejemplo de azúcares que no ocurren en forma natural para uso en agentes de iARN se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/11829, presentada en Abril 16, 2003.

Un agente de iARN puede incluir un enlace de internucleótido (*por ejemplo*, el enlace de fosforotioato quiral) útil para aumentar la resistencia de nucleasa. Adicionalmente, o en la alternativa, un agente de iARN puede incluir un imitador de ribosa para el aumento de la resistencia de nucleasa. Los enlaces de internucleótidos de ejemplo e imitadores de ribosa para aumento de la resistencia de nucleasa se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada en Marzo 8, 2004.

Un agente de iARN puede incluir subunidades de monómero conjugados de ligando y monómeros para síntesis de oligonucleótido. Los monómeros de ejemplo se describen en la Solicitud Estadounidense No. 10/916,185, presentada en Agosto 10, 2004.

Un agente de iARN puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada en Marzo 8, 2004.

Un agente de iARN se puede complejar con una unidad estructural anfipática. Las unidades estructurales anfipáticas de ejemplo para uso con agentes de iARN se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada en Marzo 8, 2004.

En otra realización, el agente iARN se puede complejar a un agente de suministro que caracteriza un complejo modular. El complejo puede incluir un agente portador ligado a uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente todos los tres de): (a) un agente de condensación (*por ejemplo*, un agente capaz de atraer, *por ejemplo*, unir, un ácido nucleico, *por ejemplo*, a través de interacción iónica o electrostática); (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 objetivo, *por ejemplo*, un agente objetivo de célula o tejido, *por ejemplo*, una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une a un tipo celular específico. Los agentes de iARN complejados a un agente de suministro se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada en Marzo 8, 2004.

Un agente de iARN puede tener pares no canónicos, tal como entre las secuencias sentido y antisentido del dúplex iARN. Las características de ejemplo de los agentes de iARN no canónicos se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada en Marzo 8, 2004.

Resistencia de nucleasa mejorada

Un agente de iARN, *por ejemplo*, un agente de iARN que dirige alfa-ENaC, puede tener resistencia mejorada a las nucleasas.

Una forma de aumentar la resistencia es identificar los sitios de división y modificar dichos sitios para inhibir la división, como se describe en la Solicitud Estadounidense No. 60/559,917, presentada en Mayo 4, 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 división. En ciertas realizaciones, todas las pirimidinas de un agente de iARN llevan una modificación 2' en la cadena sentido, la cadena anti-sentido, o ambas cadenas, y el agente iARN por lo tanto tiene resistencia mejorada a las endonucleasas. También se puede lograr resistencia mejorada de nucleasa al modificar el nucleótido 5', que resulta, por ejemplo, en por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3') en donde la uridina es un nucleótido modificado 2'; por lo menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado 2'; por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado 2'; por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado 2'; o por lo menos un dinucleótido 5'-citidina-citidina-3' (5'-cc-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado 2', como se describe en la Solicitud Internacional No. PCT/US2005/018931, presentada en Mayo 27, 2005. El agente iARN puede incluir por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4 o por lo menos 5 de dichos dinucleótidos. En una realización particularmente preferida, el nucleótido 5' en todas la ocurrencias de los motivos de secuencia 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en la cadena sentido, la cadena anti-sentido, o ambas cadenas es un nucleótido modificado. Preferiblemente, el nucleótido 5' en todas la ocurrencias de los motivos de secuencia 5'-ua-3', 5'-ca-3' y 5'-ug-3' en la cadena sentido, la cadena anti-sentido, o ambas cadenas es un nucleótido modificado. Más preferiblemente, todos los nucleótidos pirimidina en la cadena sentido son nucleótidos modificados, y el nucleótido 5' en todas la ocurrencias de los motivos de secuencia 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en la cadena anti-sentido son nucleótidos modificados, o en donde la cadena anti-sentido no comprende ni un motivo 5'-ua-3' ni un motivo 5'-ca-3', en todas la ocurrencias del motivo de secuencia 5'-ug-3'.

Preferiblemente, el nucleótido modificado 2' incluye, por ejemplo, una unidad de ribosa modificada 2', *por ejemplo*, el grupo 2'-hidroxilo (OH) se puede modificar o reemplazar con una serie de diferentes sutituyentes "oxi" o "desoxi".

Ejemplos de modificaciones del grupo hidroxilo "oxi"-2' incluyen alcoxi o ariloxi (OR, *por ejemplo*, R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que se conecta el hidroxilo 2', *por ejemplo*, mediante un puente de metileno, para el carbono 4' del mismo azúcar ribosa; O-AMINA y aminoalcoxi, $O(CH_2)_nAMINA$, (*por ejemplo*, AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterocicil amino, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, o diheteroaril amino, etileno diamina, poliamino). Es de destacar que los oligonucleótidos que contienen solo el grupo metoxietilo group (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado PEG), exhibe estabilidades de nucleasa comparables con aquellas modificadas con la modificación robusta de fosforotioato.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir azúcares desoxiribosa, que son de relevancia particular a las porciones salientes parcialmente del ARN ds); halo (*por ejemplo*, fluoro); amino (*por ejemplo* NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterocicilo, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, diheteroaril amino, o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINA$ (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterocicil amino, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, o diheteroaril amino), -NHC (OR (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquinilo, que se puede sustituir opcionalmente con *por ejemplo*, una funcionalidad amino.

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

La inclusión de azúcares furanosa en la estructura principal de oligonucleótidos también puede reducir la división endonucleolítica. Un agente de iARN se puede modificar adicionalmente al incluir un grupo catiónico 3', o al invertir el nucleósido en el terminal 3' con un enlace 3'-3'. En otra alternativa, el terminal 3' se puede bloquear con un grupo aminoalquilo, *por ejemplo*, un aminoalquilo dT 3' C5. Otros conjugados 3' pueden inhibir la división exonucleolítica 3'-5'. Aunque no esté limitado por la teoría, un conjugado 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la división exonucleolítica al bloquear estéricamente la exonucleasa de unión en el extremo 3' del oligonucleótido. Incluso cadenas pequeñas alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxiribosa, glucosa etc.) puede bloquear las exonucleasas 3'-5'.

La división nucleolítica también se puede inhibir mediante la introducción de modificaciones de ligador de fosfato, *por ejemplo*, enlaces de fosforotioato. Sin embargo, los agentes de iARN preferidos incluyen dímeros de nucleótido enriquecidos o puros para una forma quiral particular de un grupo de fosfato modificado que contiene un heteroátomo en una posición de no puenteado ocupado normalmente por oxígeno. El heteroátomo puede ser S, Se, Nr_2 , o Br_3 . Cuando el heteroátomo es S, se prefiere el enlace Sp enriquecido o quiralmente puro. Enriquecido significa por lo menos 70, 80, 90, 95, o 99 % de la forma preferida. Los enlaces de fosfato modificados son particularmente eficientes en inhibir la división exonucleolítica cuando se introduce cerca a las posiciones de terminal 5'- o 3', y preferiblemente las posiciones de terminal 5', de un agente de iARN.

Los conjugados 5' también pueden inhibir la división exonucleolítica 5'-3'. Aunque no esté limitado por la teoría, un conjugado 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la división exonucleolítica al bloquear estéricamente la exonucleasa de la unión al extremo 5' de oligonucleótido. Incluso cadenas alquilo pequeñas, grupos arilo, o

conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (Dribosa, desoxiribosa, glucosa etc.) puede bloquear 3'-5'-exonucleasas.

Un agente de iARN puede tener aumento en la resistencia a nucleasas cuando un agente de iARN dúplex incluye un nucleótido saliente de cadena sencilla en por lo menos un extremo. En realizaciones preferidas, el nucleótido saliente incluye 1 a 4, preferiblemente 2 a 3, nucleótidos no apareados. En una realización preferida, el nucleótido no apareado de la saliente de cadena sencilla que es directamente adyacente al par de nucleótido terminal contiene una base purina, y el par de nucleótido terminal es un par G-C, o por lo menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares G-C. En realizaciones adicionales, el nucleótido saliente puede tener 1 o 2 nucleótidos no apareados, y en una realización de ejemplo el nucleótido saliente es 5'-gc-3'. En realizaciones preferidas, el nucleótido saliente está en el extremo 3' de la cadena anti-sentido. En una realización, el agente iARN incluye el motivo 5'-cgc-3' en el extremo 3' de la cadena anti-sentido, de tal manera que se forma una saliente 2-nt 5'-gc-3'.

Sin embargo, un agente de iARN puede incluir modificaciones con el fin de inhibir la degradación, *por ejemplo*, mediante nucleasas, *por ejemplo*, endonucleasas o exonucleasas, encontradas en el cuerpo de un sujeto. Estos monómeros se denominan aquí como RMN, o Monómeros que promueven la Resistencia a la Nucleasa, las modificaciones correspondientes como modificaciones RMN. En muchos casos estas modificaciones modularán otras propiedades del agente iARN también, *por ejemplo*, la capacidad de interactuar con una proteína, *por ejemplo*, una proteína de transporte, *por ejemplo*, albúmina de suero, o un elemento del RISC, o la capacidad de la primera y segunda secuencias para formar un dúplex con otro o para formar un dúplex con otra secuencia, *por ejemplo*, una molécula objetivo.

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

Las modificaciones de MRN incluyen algo que se puede poner solo en el terminal y otros que puede ir en cualquier posición. Algunas modificaciones de MRN pueden inhibir hibridación de tal manera que es preferible utilizarlos solo en regiones terminales, y preferible no utilizarlos en el sitio de división o en la región de división de una secuencia que dirige una secuencia objetivo o gen, particularmente en la cadena anti-sentido. Se pueden utilizar en cualquier parte en una cadena sentido, siempre que se mantenga suficiente hibridación entre las dos cadenas del agente de iARN ds. En algunas realizaciones es deseable poner la MRN en el sitio de división o en la región de división de una cadena sentido, ya que puede minimizar la inactivación objetivo.

En la mayoría de casos, se distribuirán modificaciones MRN de forma diferente dependiendo de si están comprendidas en una cadena sentido o cadena anti-sentido. Si en una cadena anti-sentido, las modificaciones que interfieren con o inhiben la división endonucleasa no se deben insertar en la región que se somete a división mediada por RISC, *por ejemplo*, el sitio de división o la región de división (Como se describe en Elbashir *et al.*, 2001, Genes and Dev. 15: 188, incorporado aquí mediante referencia). La división del objetivo ocurre aproximadamente en la mitad de una cadena anti-sentido 20 o 21 nt, o aproximadamente 10 o 11 nucleótidos en la dirección 5' del primer nucleótido en el mRNA objetivo que es complementario a la cadena anti-sentido. Como se utiliza aquí el sitio de división se refiere a los nucleótidos en el lado del sitio de división, en el objetivo o en la cadena del agente iARN que la hibrida. La región de división significa los nucleótidos dentro de 1, 2, o 3 nucleótidos del sitio de división, en cualquier dirección.

Dichas 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 sentido o cadena anti-sentido.

Ligandos Atados

Las propiedades de un agente de iARN, que incluyen sus propiedades farmacológicas, se pueden influenciar y adaptar, *por ejemplo*, mediante la introducción de ligandos, *por ejemplo* ligandos atados. Adicionalmente, las propiedades farmacológicas de un agente de iARN se pueden mejorar al incorporar un ligando en una formulación del agente iARN cuando el agente iARN puede tener o tiene un ligando atado.

Se puede atar una amplia variedad de entidades, *por ejemplo*, ligandos, con un agente de iARN o utiliza con conjugado o aditivo de formulación, *por ejemplo*, para el portador de una subunidad de monómero conjugado con ligando. Los ejemplos se describen adelante en el contexto de una subunidad de monómero conjugado con ligando pero que solo se prefiere, las entidades se pueden acoplar en otros puntos a un agente de iARN.

Las unidades estructurales preferidas son ligandos, que se acoplan, preferiblemente covalentemente, ya sea directamente o indirectamente, por medio de un amarre de intervención al portador. En realizaciones preferidas, el ligando se une al portador por medio de un amarre de intervención. El ligando o ligando de amarre puede estar

presente en el monómero conjugado con ligando cuando el monómero conjugado con ligando se incorpora en la cadena en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando se puede incorporar en una subunidad de monómero conjugada con ligando "precursora" después que se ha incorporado una subunidad de monómero conjugada con ligando "precursora" se ha incorporado la cadena en crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, *por ejemplo*, un atadura que termina en amino, *por ejemplo*, TAP-(CH₂)_nNH₂ se puede incorporar en una cadena sentido o cadena anti-sentido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de incorporación de la subunidad de monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo electrófilo, *por ejemplo*, un éster pentafluorofenilo o grupo aldehído, se puede unir posteriormente al monómero conjugado con el ligando precursor al acoplar el grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal del amarre de la subunidad de monómero conjugado con el ligando precursor.

En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, dirección o vida útil de un agente de iARN en el que se incorpora. En realizaciones preferidas un ligando proporciona una afinidad mejorada para un objetivo seleccionado, *por ejemplo*, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, *por ejemplo*, un compartimiento celular o compartimiento de órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, cuando, *por ejemplo*, se compara con una especie ausente de dicho ligando.

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

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, *por ejemplo*, para mejorar la absorción; compuestos diagnósticos o grupos indicadores *por ejemplo*, para supervisar la distribución; agentes de entrecruzamiento; unidades estructurales que confieren resistencia a nucleasa; y nucleobases naturales o inusuales. Ejemplos generales incluyen moléculas lipófilas, lípidos, lectinas, esteroides (*por ejemplo*, uvaol, hecigenina, diosgenina), terpenos (*por ejemplo*, triterpenos, *por ejemplo*, sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado de epifriedelanol), vitaminas, carbohidratos (*por ejemplo*, un dextrano, pululan, chitina, chitosan, polímeros sintéticos (*por ejemplo* Oligo Lactato 15-mer) y naturales (*por ejemplo* de bajo y medio peso molecular), inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, aglutinantes a proteínas, moléculas que dirigen integrina, policatiónicos, péptidos, poliaminas, e imitadores de péptido. Otros ejemplos incluyen ácido fólico o ligandos epiteliales de receptor, tal como transferina.

El ligando puede ser una molécula que ocurre en forma natural o recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, *por ejemplo*, un ácido poliamino sintético. Ejemplos de ácidos poliamino incluyen polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero de anhídrido de estireno-ácido maleico, copolímero de poli(L-lacturoco-glicólico), copolímero de divinil éter- anhídrido maleico, copolímero N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Ejemplo de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina de imitador de péptido, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, unidades estructurales catiónicas, *por ejemplo*, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido alfa helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos objetivo, *por ejemplo*, un agente objetivo de tejido o célula, *por ejemplo*, un tirotopina, melanotropina, proteína S de tensoactivo, carbohidrato mucina, un poliaminoácido glucosilado, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, o un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) o imitador de péptido RGD.

Los ligandos pueden ser proteínas, *por ejemplo*, glucoproteínas, 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 de cáncer, célula endotelial, o célula de hueso. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormona. Estos también pueden incluir especies no peptídicas, tal como co-factores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, mannososa multivalente, o fucosa multivalente.

El ligando puede ser una sustancia, *por ejemplo*, un fármaco, que puede aumentar la absorción del agente iARN en la célula, *por ejemplo*, al interrumpir el citoesqueleto de la célula, *por ejemplo*, al interrumpir los microtúbulos de la célula, microfilamentos, y/o filamentos intermedios. El fármaco puede ser, *por ejemplo*, taxón, vincristina, vinblastina, citochalasin, nocodazol, japlakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, mioservina, tetraciclina.

En un aspecto, el ligando es un lípido o molécula con base en lípido. Dicho lípido o molécula con base en lípido se une preferiblemente a la proteína de suero, *por ejemplo*, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de unión HSA permite la distribución del conjugado a un tejido objetivo, *por ejemplo*, tejido de hígado, que incluye células parenquimales del hígado. Otras moléculas que se pueden unir a HSA también se pueden utilizar como ligandos. Por ejemplo, se puede utilizar neproxina o aspirina. Un lípido o ligando con base en lípido (a) puede aumentar la

resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar la dirección o transporte en una célula objetivo o membrana celular, y/o (c) se puede utilizar para ajustar la unión a una proteína de suero, *por ejemplo*, HSA.

Se puede utilizar un ligando con base en lípido para modular, *por ejemplo*, controlar la unión del conjugado al tejido objetivo. Por ejemplo, un lípido o ligando con base en lípido que se une a HSA más fuertemente será más probablemente dirigido al riñón y por lo tanto se limpia menos probablemente del cuerpo.

En una realización preferida, el ligando con base en lípido se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de tal manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente a un tejido diferente a riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión al ligando HSA no se pueda revertir.

En otro aspecto, el ligando es una unidad estructural, *por ejemplo*, una vitamina o nutriente, que se toma por una célula objetivo, *por ejemplo*, una célula de proliferación. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular indeseada, *por ejemplo*, del tipo maligno o no maligno, *por ejemplo*, células de cáncer. Las vitaminas de ejemplo incluyen vitamina A, E, y K. Otras vitaminas de ejemplo incluyen las vitaminas B, *por ejemplo*, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes tomadas por las células de cáncer.

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación de célula, preferiblemente un agente de permeación de célula helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente de ejemplo es un péptido tal como tat o antennapedia. Si el agente es un péptido, se puede modificar, que incluye un imitador peptídico, invertómeros, enlaces no péptido o pseudo-péptido, y uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y lipófila. El agente de permeación de célula se puede unir covalentemente al agente iARN o ser parte de un complejo de iARN-péptido.

Modificaciones de 5'-Fosfato

En realizaciones preferidas, los agentes de iARN son 5' fosforilados o incluyen un análogo fosforilo en el terminal prima 5'. Las modificaciones de 5'-fosfato de la cadena anti-sentido incluyen aquellas que son compatibles con inactivación de gen mediada por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-OP (HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa 5'-guanosina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa 5'-adenosina (App), y cualquier estructura de tapa de nucleótido modificada o no modificada (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortioato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato reemplazado con oxígeno/azufre, difosfato y trifosfatos (*por ejemplo* 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2) (O)P-O-5'), 5'-alquifosfonatos (R=alquil=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)2(O)P-5'- CH2-), 5'-alquileterfosfonatos (R=alquileter=metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5'-).

La cadena sentido se puede modificar con el fin de inactivar la cadena sentido y evitar la formación de un RISC activo, reduciendo potencialmente por lo tanto los efectos objetivo. Esto se puede llevar a cabo una modificación que evita la fosforilación 5' de la cadena sentido, *por ejemplo*, mediante modificación con un ribonucleótido 5'-O-metilo (véase Nykänen et al., (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the interfering of RNA pathway. Cell 107, 309-321.) Otras modificaciones que evitan la fosforilación también se pueden utilizar, *por ejemplo*, sustituyendo simplemente el 5'-OH por H a diferencia de OMe. Alternativamente, se puede agregar un grupo de gran volumen al 5'-fosfato convirtiéndolo en un enlace fosfodiéster.

Nucleobases No Naturales

Nitropirrolilo y nitroindolilo son nucleobases no naturales que son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquellos compuestos que se pueden reemplazar cualquiera de las cuatro bases que ocurren en forma natural sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión o actividad del dúplex de oligonucleótido. En contraste para las interacciones de unión de hidrógeno estabilizante asociado con nucleobases que ocurren en forma natural, se postula que los dúplex de oligonucleótido que contienen nucleobases 3-nitropirrolilo se estabilizan únicamente mediante aplamamiento de las interacciones. La ausencia de las interacciones de unión de hidrógeno significativas con nucleobases nitropirrolilo obvia la especificidad de una base complementaria específica. Adicionalmente, diversos informes confirman que 4-, 5- y 6-nitroindolilo exhibe poca especificidad para las cuatro bases naturales. De forma interesante, un dúplex de oligonucleótido que contiene 5-nitroindolilo es más estable que los oligonucleótidos correspondientes que contienen 4-nitroindolilo y 6-nitroindolilo. 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 hipoxantínilo, isoinosínilo, 2-azainosínilo, 7-deaza-inosínilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobenzimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, y derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, que incluye

procedimientos sintéticos, de nitropirrolilo, nitroindolilo, y otras bases universales mencionadas anteriormente véase Vallone et al., *Nucleic Acids Research*, 27(17):3589-3596 (1999); Loakes et al., *J. Mol. Bio.*, 270:426-436 (1997); Loakes et al., *Nucleic Acids Research*, 22(20):4039-4043 (1994); Oliver et al., *Organic Letters*, Vol. 3(13): 1977-1980 (2001); Amosova et al., *Nucleic Acids Research*, 25(10):1930-1934 (1997); Loakes et al., *Nucleic Acids Research*, 29(12):2437-2447 (2001); Bergstrom et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:1201-1209 (1995); Franchetti et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 11:67-69 (2001); y Nair et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 20(4-7):735-738 (2001).

El difluorotolil es una nucleobase no natural que funciona como una base universal. El difluorotolil es un isoéster de la timidina nucleobase natural. Pero a diferencia de la timina, el difluorotolil no muestra selectividad apreciable de cualquiera de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funciona como bases universales y son susceptibles para la presente descripción son 4-fluoro-6-metilbenzimidazol y 4-metilbenzimidazol. Adicionalmente, los derivados isocarboestirilil relativamente hidrófobos 3-metilo isocarboestirililo, 5-metilo isocarboestirililo, y 3-metil-7-propinil isocarboestirilil son bases universales que provocan solo desestabilización ligera de los dúplex de oligonucleótido comparado con la secuencia de oligonucleótidos que contiene solo bases naturales. Otras nucleobases no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirililo, 7-propinil isocarboestirililo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenaantraceno, pirenilo, estilbenilo, tetraceno, pentaceno, y derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, que incluyen procedimientos sintéticos, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbenzimidazol, 4-metilbenzimidazol, y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, véase: 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 Patente Estadounidense No. 6,218,108.

Transporte de agentes de iARN en las células

Sin desear estar vinculado con ninguna teoría, la similitud química entre los agente de iARN conjugados con colesterol y ciertos constituyentes de lipoproteínas (*por ejemplo* colesterol, ésteres colesterilo, fosfolípidos) puede conducir a la asociación de los agentes de iARN con lipoproteínas (*por ejemplo* LDL, HDL) en sangre y/o la interacción del agente iARN con componentes celulares que tienen una afinidad para colesterol, *por ejemplo* componentes de la ruta de transporte de colesterol. Las lipoproteínas así como también sus constituyentes se toman y se procesan por células mediante diversos mecanismos de transporte activo y pasivo, *por ejemplo*, sin limitación, endocitosis del LDL unido al receptor LDL, endocitosis de LDL oxidado o de otra forma modificado a través de interacción con receptor secuestrante A, la absorción mediada por el receptor secuestrante B1 de colesterol HDL en el hígado, pinocitosis, o transporte de colesterol a través de las membranas mediante proteínas transportadoras ABC (casete de unión ATP), *por ejemplo* ABC-A1, ABC-G1 o ABC-G4. Por lo tanto, los agentes de iARN conjugados con colesterol pueden disfrutar de la absorción facilitada por células que poseen dichos mecanismos de transporte, *por ejemplo* células hepáticas. Como tal, la presente descripción proporciona evidencia y métodos generales para dirigir los agentes de iARN a las células que expresan ciertos componentes de superficie celular, *por ejemplo* receptores, al conjugar un ligando natural para dicho componente (*por ejemplo* colesterol) al agente iARN, o al conjugar una unidad estructural química (*por ejemplo* colesterol) al agente iARN que se asocia con o se une a un ligando natural para el componente (*por ejemplo* LDL, HDL).

Otras Realizaciones

Un agente de iARN, se puede producir en una célula *in vivo*, *por ejemplo*, de plantillas de ADN exógenas que se suministran en la célula. *Por ejemplo*, las plantillas de ADN se pueden insertar en vectores y utilizar como vectores de terapia de gen. Los vectores de terapia de gen se pueden suministrar a un sujeto mediante, *por ejemplo*, inyección intravenosa, administración local (Patente Estadounidense No. 5,328,470), o mediante inyección estereotáctica (véase, *por ejemplo*, Chen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057, 1994). La preparación farmacéutica del vector de terapia de gen puede incluir el vector de terapia de gen en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se puede incorporar el vehículo de suministro de gen. Las plantillas de ADN, *por ejemplo*, pueden incluir dos unidades de transcripción, una que produce un transcritto que incluye una cadena superior de un agente de iARN y una que produce un transcritto que incluye la cadena inferior de un agente de iARN. Cuando las plantillas se transcriben, se produce el agente iARN, y se procesa en fragmentos de agentes de iARN que median la inactivación del gen.

Formulación

La presente descripción también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen compuestos de dsARN. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una serie de formas dependiendo de si se

desea tratamiento local o sistémico y luego el área que se va a tratar. La administración puede ser tópica, pulmonar, *por ejemplo*, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracranial, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rociadores, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosos, los espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. También pueden ser útiles condones recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las que los dsARN están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensoactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidil etanolamina = DOPE, dimiristoilfosfatidil colina = DMPC, distearoilfosfatidil colina) negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidil glicerol = DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleoilfosfatidilaminopropilo = DOTAP y dioleoilfosfatidil etanolamina = DOTMA), por ejemplo bromuro de (+/-)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodecilo)-1-propanamino = GAP-DLRIE). Los DsARN se pueden encapsular dentro de liposomas o pueden formar complejos de los mismos, en particular en liposomas catiónicos. Alternativamente, se pueden complejar dsARN en lípidos, en particular en lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un alquil éster C₁₋₁₀ (por ejemplo isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la Solicitud de Patente Estadounidense Ser. No. 09/315,298 presentada en Mayo 20, 1999.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en medio acuoso o no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsificantes, auxiliares dispersantes o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que se administran los dsARN en conjunto con uno o más mejoradores de penetración, tensoactivos, y quelantes. Los tensoactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales preferidos incluyen ácido chenodesoxicólico (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 láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo sodio). También se prefieren combinaciones de mejoradores de penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los mejoradores de penetración adicionales incluyen polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. Los DsARN se pueden suministrar de forma oral, en forma granular que incluye partículas secas rociadas, o complejar para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de DsARN incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivadas de DEAE, polulanos, celulosas y almidones. Particularmente los agentes complejantes preferidos incluyen quitosán, N-trimetilchitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, polisperminas, protamina, polivinilpiridina, politiiodetilaminometileno 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), ácido poli(DL-lactic-co-glicólico (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para los dsARN y su preparación se describen en detalle en la solicitud Estadounidense Ser. No. 08/886,829 (presentada en Jul. 1, 1997), Ser. No. 09/108,673 (presentada en Jul. 1, 1998), Ser. No. 09/256,515 (presentada en Feb. 23, 1999), Ser. No. 09/082,624 (presentada en Mayo 21, 1998) y Ser. No. 09/315,298 (presentada en Mayo 20, 1999).

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados tal como, pero no limitado a, mejoradores de penetración, compuestos portadores y otros portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposoma. Estas composiciones se pueden generar de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos auto-emulsificantes y semi-sólidos auto-emulsificantes.

Las formulaciones farmacéuticas, que pueden estar presentes convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con los portadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan al poner uniformemente e íntimamente en contacto los
 5 ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, formar el producto.

Las composiciones se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tal como, pero no limitado a, comprimidos, cápsulas, gel cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios, y enemas. Las composiciones también se pueden formular como suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mezclas. Las
 10 suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización las composiciones farmacéuticas se pueden formular y utilizar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tal como, pero no limitado a, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas y liposomas. Mientras sean similares en la naturaleza estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de dichas composiciones y formulaciones se conoce de manera general por aquellos expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación y se pueden aplicar a la formulación de las composiciones.

Emulsiones

Las composiciones se pueden preparar y formular como emulsiones. las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en la forma de gotas que exceden usualmente 0.1 mm de diámetro (Idson, in Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones son frecuentemente sistemas bifásicos que comprenden dos fases inmiscibles en líquido mezcladas íntimamente y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de cualquier variedad de agua en aceite (w/o "por sus iniciales en inglés") o aceite en agua (o/w "por sus iniciales en inglés"). Cuando se divide finamente una fase acuosa en y se dispersa como gotas diminutas en una fase aceitosa voluminosa, la composición resultante se denomina una emulsión agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando se divide finamente la fase aceitosa en y se dispersa como gotas diminutas en una fase acuosa voluminosa, 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 pueden estar presentes como una solución en la fase acuosa, fase aceitosa o en sí mismo como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tal como emulsificantes, estabilizantes, tintes, y anti-oxidantes también pueden estar presentes en emulsiones según se necesite. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser múltiples emulsiones que están comprendidas de más de dos fases tal como, por ejemplo, en el caso de emulsiones aceite en agua-en aceite (o/w/o) y agua-aceite en agua (w/o/w). Dichas formulaciones complejas proporcionan frecuentemente ciertas ventajas como no lo hacen las emulsiones binarias simples. Múltiples emulsiones en las que las gotas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran gotas de agua pequeñas que constituyen una emulsión w/o/w. De forma similar un sistema de gotas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua aceitosa proporciona una emulsión o/w/o.

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

Los tensoactivos sintéticos, también conocidos agentes activos de superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, in Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensoactivos son normalmente anfífilicos y comprenden una parte hidrófila y una parte hidrófoba. La relación de la naturaleza hidrófila a la naturaleza hidrófoba del tensoactivo se ha denominado el balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en categorizar y seleccionar tensoactivos en la preparación de formulaciones. Los tensoactivos se pueden clasificar en diferentes clases con base en la naturaleza

del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfotéricos (Rieger, in *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

5 Los emulsificantes que ocurren en forma natural utilizados en formulaciones de emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfatidas, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas de tal manera que se pueden tomar en agua para formar emulsiones w/o reteniendo aún sus consistencias semi-sólidas, tal como lanolina anhidra y petrolato hidrófilo. Los sólidos finamente divididos también se han utilizado como buenos emulsificantes especialmente en combinación con tensoactivos y en preparaciones viscosas. Estas incluyen sólidos inorgánicos polares, tal como hidróxidos de metal pesados, arcillas no hinchables tal como bentonita, atapulgita, hectorita, caolina, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tal como triestearato de carbono o glicerilo.

15 También se incluye una gran variedad de materiales no emulsificantes en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de emulsiones. Estas incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

20 Los coloides o hidrocoloides hidrófilos incluyen gomas que ocurren en forma natural y polímeros sintéticos tal como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginíci, carragenano, goma guar, goma karaya, y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa, y polímeros carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones al formar películas interfaciales fuertes alrededor de las gotas de fase dispersa y al aumentar la viscosidad de la fase externa.

25 Debido a que las emulsiones contienen frecuentemente un número de ingredientes tal como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfatidas que se pueden soportar fácilmente por el crecimiento de microbios, estas formulaciones incorporan frecuentemente. Los conservantes comúnmente utilizados incluidos en las formulaciones de emulsión incluyen metil parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. Los antioxidantes también se agregan comúnmente a formulaciones de emulsión para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes utilizados pueden ser secuestrantes de radicales libres tal como tocoferoles, alquil galatos, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes de reducción tal como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas antioxidantes tal como ácido cítrico, ácido tartárico, y lecitina.

35 La aplicación de formulaciones de emulsión por medio de las rutas dermatológicas, oral y parenteral y métodos para su fabricación se han revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones de emulsión para el suministro oral se han utilizado ampliamente debido a la facilidad de la formulación, así como también eficacia desde un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosification 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 las preparaciones nutritivas altas en grasa están entre los materiales que se han administrado comúnmente oralmente como emulsiones o/w.

45 En una realización, las composiciones de dsARN y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y amfifilo que es una solución de líquido isotrópica y termodinámicamente estable única (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Normalmente las microemulsiones son sistemas que se preparan al dispersar primero un aceite en una solución tensoactiva acuosa y luego se agrega una cantidad suficiente de un cuarto componente, de manera general un alcohol de longitud de cadena intermedio para formar un sistema transparente. Por lo tanto, también se han descrito microemulsiones como dispersiones isotrópicamente claras, termodinámicamente estables, de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas activas de superficie (Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polimers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Las microemulsiones comúnmente se preparan por medio de una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensoactivo, co-tensoactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o un aceite en agua (o/w) es dependiente de las propiedades del aceite y tensoactivo utilizado y en la estructura y empaque geométrico de las cabezas polares y colas de hidrocarburo de las moléculas de tensoactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El método fenomenológico que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensamente y ha producido un conocimiento comprensivo, para un experto en la técnica, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en

Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en Pharmaceutical Dosification Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335). Comparado con emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensoactivos utilizados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos iónicos, tensoactivos no iónicos, Brij 96, polioxietileno ésteres, ésteres de ácido graso poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (M0310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (M0750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solos o en combinación con cotensoactivos. El cotensoactivo, usualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol, y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial al penetrar en la película de tensoactivo y posteriormente crear una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensoactivo. Las microemulsiones, sin embargo, se pueden preparar sin el uso de cotensoactivos y sistemas microemulsión auto-emulsificante libre de alcohol se conocen en la técnica. La fase acuosa normalmente puede ser, pero no se limita a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles, y derivados de etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero no se limita a, materiales tal como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graso, mono, di, y tri-glicéridos de cadena media (C₈-C₁₂), ésteres de ácido graso de gliceril polioxietilado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C₈-C₁₀ poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de solubilización del fármaco y la absorción mejorada de fármacos. Las microemulsiones basadas en lípido (o/w y w/o) se han propuesto para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos, que incluyen péptidos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización mejorada del fármaco, protección del fármaco de hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por tensoactivo en fluidez de membrana y permeabilidad, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada, y toxicidad reducida (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Frecuentemente las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se ponen juntos hasta temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o dsARN. Las microemulsiones también son efectivas en el suministro transdérmico de componentes activos en aplicaciones cosméticas y farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión facilitará aumento de la absorción sistémica de dsARN y ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal, así como también mejoran la captación celular local de dsARN y ácidos nucleicos dentro del tracto gastrointestinal, vagina, cavidad bucal y otras áreas de administración.

Los microemulsiones también pueden contener componentes y aditivos adicionales tal como monostearato de sorbitan (Grill 3), Labrasol, y mejoradores de penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para mejorar la absorción de los dsARN y ácidos nucleicos de la presente invención. Los mejoradores de penetración útiles en las microemulsiones se pueden clasificar como que pertenecen a una de las cinco categorías amplias de tensoactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no tensoactivos no quelantes (Lee et al., Critical Reviews en Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha discutido anteriormente.

Liposomas

Se presentan muchas estructuras de tensoactivo organizadas a pesar de microemulsiones que se han estudiado y utilizado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tal como liposomas, han atraído gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro de fármaco. El término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Las liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un acuoso interior. La porción acuosa contiene la composición que se va a suministrar. Las liposomas catiónicas poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse a la pared celular. Las liposomas no catiónicas, aunque no permiten fusionarse eficientemente con la membrana celular, se toman mediante macrófagos in vivo.

Con el fin de cruzar la piel de mamífero intacta, las vesículas de lípido pueden pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro de menos de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable utilizar una liposoma que es altamente deformable y capaz de pasar a través de dichos poros finos.

Las ventajas adicionales de liposomas incluyen; liposomas obtenidas de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; las liposomas pueden incorporar un amplio rango de fármacos solubles en agua y lípidos; las

liposomas pueden proteger los fármacos encapsulados en sus compartimientos internos de metabolismo y degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Las consideraciones importantes en la preparación de formulaciones liposoma son la carga de superficie de lípido, tamaño de vesícula y el volumen acuoso de las liposomas.

Las liposomas son útiles para la transferencia y el suministro de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando las liposomas se aplican a un tejido, las liposomas empiezan a combinarse con las membranas celulares y cuando progresa la combinación de la liposoma y el progreso de la célula, los contenidos liposómicos se vacían en la célula en donde puede actuar el agente activo.

Las formulaciones liposómicas han sido el foco de investigación extensiva como el modo de suministro de muchos fármacos. Se presenta evidencia creciente para administración tópica, las liposomas presentan diversas ventajas sobre otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen efectos colaterales reducidos con alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en el objetivo deseado, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, hidrófilos e hidrófobos, en la piel.

Diversos informes han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes que incluyen ADN de alto peso molecular en la piel. Los compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular se han administrado a la piel. La mayoría de aplicaciones resulta en la dirección de la epidermis superior.

Las liposomas caen en dos clases amplias. Las liposomas catiónicas son liposomas cargadas positivamente que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo de 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, las liposomas se rompen, liberando sus contenidos en el citoplasma de la célula (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles a pH o cargados negativamente, atrapan el ADN a diferencia del complejo con este. Debido a que el ADN y el lípido se cargan de forma similar, ocurre repulsión a diferencia de formación de complejo. No obstante, algo del ADN se atrapa dentro del acuoso interior de estas liposomas. Las liposomas sensibles a pH se han utilizado para suministrar ADN que codifica el gen quinasa timidina para las monocapas de la célula en el cultivo. La expresión del gen exógeno se detecta en las células objetivo (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposómica incluye fosfolípidos diferentes a fosfatidilcolina derivada en forma natural. Las composiciones de liposoma neutras, por ejemplo, se pueden formar de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposoma aniónicas de manera general se forman de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que las liposomas fusogénicas aniónicas se forman principalmente de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Se forma otro tipo de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Diversos estudios han probado el suministro tópico de formulaciones de fármaco liposómico para la piel. La aplicación de liposomas que contiene interferón para la piel de conejillo de indias que resulta en una reducción de úlceras de herpes en la piel mientras suministra el interferón mediante otros medios (por ejemplo como una solución o como una emulsión) que son inefectivos (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Adicionalmente, un estudio adicional prueba la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposómica para la administración de interferón utilizando un sistema acuoso, y concluye que la formulación liposómica es superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas liposómicos no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden el tensoactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome.TM. I (gliceril dilaurato/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) y Novasome.TM. II (gliceril diestearato/ colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) se utilizan para suministrar ciclosporina-A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indican que dichos sistemas liposómicos no iónicos son efectivos en facilitar el depósito de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu et al. *S.T.P.Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

Las liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizadas", un término que, como se utiliza aquí, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorpora en liposomas, resultan en tiempos de vida de circulación mejorados con relación a liposomas que carecen de lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellas en las que parte de la porción de lípido que forma vesícula de la liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tal como monosialogangliósida Gm1, o (B) se deriva con uno o más polímeros hidrófilos, tal como una unidad estructural de polietilenglicol (PEG).

Aunque no esté vinculado en ninguna teoría particular, se considera en la técnica que, por lo menos para liposomas estéricamente estabilizadas que contienen gangliosidas, esfingomiélinea, o lípidos derivados PEG, la vida útil de circulación mejorada de estas liposomas estéricamente estabilizadas se deriva de una absorción reducida en las células del sistema retículoendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Se conocen en la técnica diversos liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) reporta la capacidad de monosialogangliosida Gm1, sulfato de galactocerebrosida y fosfatidilinositol para mejorar las vidas útiles de la sangre de liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). Patente Estadounidense No. 4,837,028 y WO 88/04924, ambos de Allen et al., describe liposomas que comprenden (1) esfingomiélinea y (2) la gangliosida Gm1 o un éster de sulfato galactocerebrosida. La Patente Estadounidense No. 5,543,152 (Webb et al.) describe liposomas que comprenden esfingomiélinea. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en el documento WO 97/13499 (Lim et al).

Se conocen en la técnica muchos liposomas que comprenden lípidos derivados con uno o más polímeros hidrófilos, y métodos de preparación de los mismos. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describe liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C1215G, que contiene una unidad estructural PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) observe que el recubrimiento hidrófilo de las partículas de poliestireno con glicoles poliméricos resulta en vidas útiles en sangre significativamente mejoradas. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de los grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (Patente Estadounidense Nos. 4,426,330 y 4,534,899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describe experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivados con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos en la vida media de la circulación sanguínea. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extiende dichas observaciones a otros fosfolípidos derivados de PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado de la combinación de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Las liposomas que tienen unidades estructurales PEG covalentemente unidas en su superficie externa se describen en la Patente Europea No. EP 0 445 131 B1 y WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposoma que contienen 1-20 mol por ciento de PE derivado con PEG, y métodos de uso del mismo, se describen por Woodle et al. (Patente Estadounidense Nos. 5,013,556 y 5,356,633) y Martin et al. (Patente Estadounidense No. 5,213,804 y Patente Europea No. EP 0 496 813 B1). Las liposomas que comprenden una serie de otros conjugados de lípido-polímero se describen en el documento WO 91/05545 y Patente Estadounidense No. 5,225,212 (ambos de Martin et al.) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Las liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en el documento WO 96/10391 (Choi et al). Patente Estadounidense No. 5,540,935 (Miyazaki et al.) y Patente Estadounidense No. 5,556,948 (Tagawa et al.) describe los liposomas que contienen PEG que se puede derivar adicionalmente con las unidades estructurales funcionales en sus superficies.

Se conoce en la técnica número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 de Thierry et al. describe métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente Estadounidense No. 5,264,221 de Tagawa et al. describe liposomas unidos a proteína y afirma que los contenidos de dichos liposomas pueden incluir dsARN. La Patente Estadounidense No. 5,665,710 de Rahman et al. describe ciertos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 de Love et al. describe liposomas que comprenden dsARN dirigidos al gen raf.

Las transfersomas son aún otro tipo de liposomas, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de suministro de fármaco. Las transfersomas se pueden describir como gotas de lípido que son altamente deformables que son capaces de penetrar fácilmente a través de poros que son más pequeños que la gota. Las transfersomas son adaptables al ambiente en las que se utilizan, por ejemplo se auto-optimizan (adaptado a la forma de poros en la piel), autoreparación, alcanza frecuentemente objetivos sin fragmentación, y frecuentemente auto-carga. Para hacer transfersomas es posible agregar activadores de borde de superficie, usualmente tensoactivos, a una composición liposómica estándar. Las transfersomas se han utilizado para suministrar albúmina de suero a la piel. El suministro mediado por transfersoma de albúmina de suero se ha mostrado que es tan efectivo como una inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina de suero.

Los tensoactivos encuentran amplia aplicación en formulaciones tal como emulsiones (que incluyen microemulsiones) y liposomas. La forma más común para clasificar y categorizar las propiedades de los muchos diferentes tipos de tensoactivos, natural y sintético, es mediante el uso del balance hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como el "líder") proporciona los medios más útiles para categorizar los diferentes tensoactivos utilizados en las formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosification Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensoactivo no se ioniza, se clasifica como un tensoactivo no iónico. Los tensoactivos no iónico encuentran amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y se utilizan sobre un amplio rango de valores de pH. En general sus valores HLB varían de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensoactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tal como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, gliceril

ésteres, poligliceril ésteres, ésteres sorbitan, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas no iónicas y éteres tal como etoxilados de alcohol graso, alcoholes propoxilados, y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensoactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensoactivo no iónico.

5 Si la molécula de tensoactivo lleva una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensoactivo se clasifica como aniónico. Los tensoactivos aniónicos incluyen carboxilatos tal como jabones, acil lactilatos, acil amidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tal como alquil sulfatos y alquil sulfatos etoxilados, sulfonatos tal como alquil benceno sulfonatos, acil isetonatos, acil tauratos y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensoactivo aniónico son los alquil sulfatos y los jabones.

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

Si la molécula de tensoactivo tiene la capacidad de llevar una carga positiva o negativa, el tensoactivo se clasifica como anfotérico. Los tensoactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfatidas.

15

Se ha revisado el uso de tensoactivos en productos de fármaco, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosification Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Mejoradores de penetración

En una realización, la presente descripción emplea diversos mejoradores de penetración para afectar el suministro eficiente de ácidos nucleicos, particularmente dsARN, a la piel de los animales. Están presentes la mayor parte de los fármacos en la solución en formas ionizadas y no ionizadas. Sin embargo, usualmente solo los fármacos lipófilos o solubles en lípidos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden cruzar las membranas celulares si la membrana que se cruza se trata con un mejorador de penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los mejoradores de penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipófilos.

20

25

Los mejoradores de penetración se pueden clasificar por pertenecer a una de las cinco categorías amplias, es decir, tensoactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y 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 mejoradores de penetración se describe adelante en mayor detalle.

30 Tensoactivos: En relación con la presente descripción, los tensoactivos (o "agentes activos de superficie") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión de la superficie de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado que se mejora la absorción de los dsARN a través de la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos mejoradores de penetración incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter y polioxietileno-20-cetil éter (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicas, tal como FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

35

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

40

45 Sales biliares: La función fisiológica de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (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). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como mejoradores de penetración. Sin embargo el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes que ocurren en forma natural de bilis así como también 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 (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido chenodesoxicólico (chenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA),

50

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).

Agentes Quelantes: Los agentes quelantes, se pueden definir como compuestos que retiran los iones metálicos de solución al formar complejos, con el resultado que se mejora la absorción de los dsARN a través de la mucosa. Con respecto a su uso como mejoradores de penetración, los agentes quelantes tienen la ventaja agregada de también servir como inhibidores DNasa, ya que la mayoría de nucleasas de ADN caracterizadas requieran un ión de metal divalente para catálisis y así se inhiben mediante agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes incluyen pero no se limitan a etilendiaminatetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados lauret-9 y N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

No tensoactivos no quelantes: Como se utiliza aquí, los compuestos que mejoran la penetración de no tensoactivo no quelante se pueden definir como compuestos que demuestran la actividad insignificante como agentes quelantes o como tensoactivos pero que no obstante mejoran la absorción de los dsARN a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de mejoradores de penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas no saturada, derivados 1-alkil- y 1-alkenilazacilo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes anti-inflamatorios no esteroides tal como diclofenaco sodio, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Los agentes que mejoran la adsorción de los dsARN en el nivel celular también se puede agregar a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tal como lipofectina (Junichi et al, Patente Estadounidense No. 5,705,188), derivados glicerol catiónicos, y moléculas policatiónicas, tal como polilisina (Lollo et al., Solicitud PCT WO 97/30731) y otros péptidos, también se conocen por mejorar la absorción celular de los dsARN.

Se pueden utilizar otros agentes para mejorar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, que incluyen glicoles tal como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tal como 2-pirrol, azonas, y terpenos tal como limoneno y mentona.

Portadores

Ciertas composiciones también incorporan compuestos portadores en la formulación. Como se utiliza aquí, "compuesto portador" o "portador" se puede referir a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no poseen actividad biológica per se) pero se reconoce como un ácido nucleico mediante procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica al, por ejemplo, degradar el ácido nucleico biológicamente activo o promueve su retiro de circulación. La co-administración de ácido nucleico y un compuesto portador, normalmente con un exceso de la última sustancia, puede resultar en una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros reservorios extracirculatorios, presumiblemente debido a competición entre el compuesto portador y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación parcialmente de un dsARN fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se co-administra 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 a un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un solvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma de administración planeada en mente, con el fin de proporcionar el volumen, consistencia deseados, 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, aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, povidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil celulosa, poliacrilatos o hidrogen fosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de sílice coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato almidón de sodio, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.).

El excipiente orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable adecuado para administración no parenteral que no reacciona perjudicialmente con ácidos nucleicos también se puede utilizar para formular las composiciones. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones de sal, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, povidona y similares.

Formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos puede incluir soluciones acuosas estériles o no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tal como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceite líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan en forma perjudicial con ácidos nucleicos.

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

Composiciones farmacéuticas para el suministro al tubo respiratorio

Otro aspecto proporciona el suministro de agentes de iARN al tubo respiratorio, particularmente para el tratamiento de fibrosis quística. El tubo respiratorio incluye las vías respiratorias superiores, que incluyen bucofaringe y laringe, seguido por las vías respiratorias inferiores, que incluyen la tráquea seguido por bifurcaciones en los bronquios y bronquiolos. Las vías respiratorias superior e inferior se denominan las vías respiratorias conductivas. Los bronquiolos terminales que dividen los bronquiolos respiratorios que luego conducen a la última zona respiratoria, los alveolos, o pulmón profundo. El epitelio de las vías respiratorias conductivas es el objetivo primario de aerosoles terapéuticos inhalados para el suministro de agentes de iARN tal como agentes de iARN alfa-ENaC.

Las composiciones de suministro pulmonar se pueden suministrar mediante inhalación por el paciente mediante una dispersión de tal manera que la composición, preferiblemente el agente iARN, dentro de la dispersión puede alcanzar el pulmón cuando esta, por ejemplo, se puede absorber fácilmente a través de la región alveolar directamente en la circulación de la sangre. El suministro pulmonar puede ser efectivo para suministro sistémico y para suministro localizado para tratar enfermedades de los pulmones.

Se puede lograr suministro pulmonar mediante diferentes métodos, que incluyen el uso de formulaciones nebulizadas, aerosolizadas, micelulares y con base en polvo seco; la administración mediante inhalación puede ser oral y/o nasal. El suministro se puede lograr con nebulizadores líquidos, inhaladores con base en aerosol, y dispositivos de dispersión de polvo seco. Se prefieren dispositivos de dosis medida. Uno de los beneficios de utilizar un atomizador o inhalador es que el potencial para contaminación se minimiza debido a que los dispositivos están auto-contenidos. Los dispositivos de dispersión de polvo seco, por ejemplo, el suministro de fármaco se puede formular fácilmente como polvos. Una composición de iARN se puede almacenar establemente como polvos liofilizados o secos por rociado por sí mismos o en combinación con portadores de polvo adecuados. El suministro de una composición para inhalación puede estar mediado por un elemento del periodo de dosificación que puede incluir un temporizador, un contador de dosis, dispositivo para medir el tiempo, o un indicador de tiempo que cuando se incorpora en el dispositivo permite seguimiento de la dosis, supervisión de cumplimiento, y/o activación de dosis para un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

Ejemplos de dispositivos farmacéuticos para suministro de aerosol incluyen inhaladores de dosis medida (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI), y nebulizadores de chorro de aire. Los sistemas de suministro de ejemplo mediante inhalación que se pueden adaptar fácilmente para el suministro de agentes de iARN al sujeto se describen en, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 5,756,353; 5,858,784; y solicitudes PCT WO98/31346; WO98/10796; WO00/27359; WO01/54664; WO02/060412. Otras formulaciones en aerosol que se pueden utilizar para suministrar los agentes de iARN se describen en la Patente Estadounidense Nos. 6,294,153; 6,344,194; 6,071,497, y solicitudes PCT WO02/066078; WO02/053190; WO01/60420; WO00/66206. Adicionalmente, los métodos para suministrar los agentes de iARN se pueden adaptar de aquellos utilizados en suministrar otros oligonucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido anti-sentido) mediante inhalación, tal como se describe en Templin et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2000, 10:359-68; Sandrasagra et al., Expert Opin Biol Ther, 2001, 1:979-83; Sandrasagra et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12:177-81.

El suministro de los agentes también puede implicar la administración de los así llamados "pro-fármacos", es decir formulaciones o modificaciones químicas de una sustancia terapéutica que requiere alguna forma de procesamiento o transporte mediante sistemas innatos para el organismo del sujeto para liberar la sustancia terapéutica, preferiblemente en el sitio en donde se desea su acción; esta última realización se puede utilizar en conjunto con el suministro al tubo respiratorio, pero también junto con otras realizaciones de la presente descripción. Por ejemplo, los pulmones humanos pueden retirar o degradar rápidamente los aerosoles depositados divididos hidrolíticamente durante periodos que varían de minutos a horas. En las vías respiratorias superiores, el epitelio ciliado contribuye a la "escalera mucociliar" mediante el cual las partículas se arrastran desde las vías respiratorias hacia la boca. Pavia,

D., "Lung Mucociliary Clearance," in *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S. W. y Pavia, D., Eds., Butterworths, London, 1984. En los pulmones profundos, los macrófagos alveolares son capaces de fagocitar las partículas pronto después de su depósito. Warheit et al. *Microscopy Res. Tech.*, 26: 412-422 (1993); y Braina, J. D., "Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages," in *The Reticuloendothelial System*, S. M. Reichard y J. Filkins, Eds., Plenum, New York., pp. 315-327, 1985.

En realizaciones preferidas, particularmente cuando se desea dosificación sistémica con el agente iARN, los agente de iARN en aerosol se formulan como micropartículas. Las micropartículas tienen un diámetro de entre 0.5 y diez micras pueden penetrar los pulmones, pasando a través de la mayoría de barreras naturales. Se requiere un diámetro de menos de diez micras para eludir la garganta; se requiere un diámetro de 0.5 micras o más para evitar ser exhalado.

Otros Componentes

Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Sin embargo, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activos tal como, por ejemplo, antiprurícticos, astringentes, anestésicos locales o agentes anti-inflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tal como tintes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se agregan, 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, emulsificantes, sales para influenciar la presión osmótica, reguladores, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan perjudicialmente con los ácidos nucleicos de la formulación.

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

Ciertas realizaciones proporcionan combinaciones y composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más agentes de dsARN y (b) uno o más de otros agentes terapéuticos que funcionan mediante un mecanismo de interferencia no ARN.

De acuerdo con lo anterior, la descripción incluye una combinación de un iARN con una sustancia de fármaco anti-inflamatoria, broncodilatadora, de antihistamina, anti-tusiva, antibiótica o DNasa, dicho bloqueador epitelial del canal de sodio y dicha sustancia de fármaco está en la misma o diferente composición farmacéutica.

Los antibióticos adecuados incluyen antibióticos macrolida, por ejemplo, tobramicina (TOBI™).

Las sustancias de fármaco de DNasa adecuadas incluyen dornasa alfa (Pulmozyme™), una solución altamente purificada de desoxiribonucleasa I humana recombinante (rhDNasa), que divide selectivamente el ADN. Se utiliza dornasa alfa para tratar fibrosis quística.

Otras combinaciones útiles de bloqueadores del canal de sodio epitelial con fármacos anti-inflamatorias son aquellas con antagonistas de receptores quimioquina, 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 CCR-5, tal como antagonistas Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; antagonistas Takeda, tal como cloruro de *N*-[[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metil-fenil)-5H-benzo-ciclohepten-8-il]carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahidro-*N,N*-dimetil-2H-piran-4-aminio (TAK-770); y antagonistas CCR-5 descritos en USP 6,166,037 (particularmente las reivindicaciones 18 y 19), documento WO 00/66558 (particularmente la reivindicación 8), documento WO 00/66559 (particularmente la reivindicación 9), documento WO 04/018425 y documento WO 04/026873.

Los fármacos anti-inflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular, glucocorticosteroides, tal como budesonida, beclometasona dipropionato, fluticasona propionato, ciclesonida o mometasona furoato, o esteroides descritos en los documentos 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), documentos 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 esteroides, tal como aquellos descritos en los documentos DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 y WO 04/26248; antagonistas LTD4, tal como montelukast y zafirlukast; inhibidores PDE4, tal como cilomilast (Ariflo® GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659 / PD168787 (Parke-Davis), AWD- 12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440

(Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y aquellos descritos en los documentos WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 y WO 04/037805; antagonistas del receptor adenosina A2B tal como aquellos descritos en el documento WO 02/42298; y agonistas de adrenoceptor beta-2, tal como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol fenoterol, procaterol, y especialmente, formoterol, carmoterol y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y compuestos (en forma libre o sal o solvato) de la fórmula (I) del documento WO 0075114, preferiblemente compuestos de los Ejemplos de los mismos, especialmente indacaterol y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, así como también compuestos (en forma libre o de sal o solvato) de la fórmula (I) del documento WO 04/16601, y también los compuestos de los documentos 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 04/108765 y WO 04/108676.

Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular, bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi), y glicopirrolato, pero también aquellos descritos en los documentos EP 424021, USP 3,714,357, USP 5,171,744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 y WO 04/05285.

Los fármacos anti-inflamatorios y broncodilatadores duales adecuados incluyen antagonistas agonistas/muscarínicos de adrenoceptor beta- dual 2 tal como aquellos descritos en los documentos USP 2004/0167167, WO 04/74246 y WO 04/74812.

Las sustancias de fármaco de antihistamina adecuados incluyen clorhidrato de cetirizina, acetaminofen, clemastina fumarato, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como también aquellos descritos en los documentos JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

Otras combinaciones de agentes útiles con fármacos anti-inflamatorios son aquellos con antagonistas de receptores quimioquina, 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 CCR-5, tal como antagonistas Schering-Plough SC-351125, SCH- 55700 y SCH-D; antagonistas Takeda, tal como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metilfenil)-5H-benzo-ciclohepten-8-il] carbonil]amino]fenil]-metil]tetrahidro-N,N-dimetil-2H-piran-4-amin-io (TAK-770), y antagonistas CCR-5 descritos en el documento USP 6,166,037 (particularmente las reivindicaciones 18 y 19), documento WO 00/66558 (particularmente la reivindicación 8), documento WO 00/66559 (particularmente la reivindicación 9), documento WO 04/018425 y documento WO 04/026873.

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

Se pueden utilizar dos o más compuestos combinados en una formulación única, en forma separada, concomitantemente o secuencialmente.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal a 50% de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 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 compuestos que exhiben altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivos de células y estudios de animal se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de composiciones se posiciona de manera general dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o sin 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 descripción, se puede estimar la dosis terapéuticamente efectiva inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos de animal para alcanzar un rango de concentración de plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto de polipéptido de una secuencia objetivo (por ejemplo, que logra una concentración reducida del

polipéptido) que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición de síntomas máxima media) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

- 5 Además de su administración individualmente o como una pluralidad, como se discutió anteriormente, los dsARN se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos efectivos en el tratamiento de trastornos relacionados con ENaC. En cualquier evento, el médico que administra puede ajustar la cantidad y el tiempo de administración de dsARN sobre la base de los resultados observados utilizando mediciones estándar de eficacia conocida en la técnica o se describen aquí.

10 Métodos de Tratamiento y Rutas de Suministro

Una composición que incluye un agente de iARN, *por ejemplo*, un agente de iARN que dirige alfa-ENaC, se puede administrar a un sujeto mediante una variedad de rutas para lograr suministro local al sitio de acción o suministro sistémico al sujeto. Las rutas de ejemplo incluyen administración local directa al sitio de tratamiento, tal como los pulmones y el pasaje nasal así como también suministro intravenoso, nasal, oral, y ocular. Los medios preferidos para administrar los agentes de iARN es a través de la administración directa a los pulmones y el pasaje nasal es una solución líquida, de aerosol o nebulizada.

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

Los compuestos activos descritos aquí se administran preferiblemente a los pulmones o el pasaje nasal de un sujeto mediante cualesquier medios adecuados. Los compuestos activos se pueden administrar al administrar una suspensión en aerosol de partículas respirables comprendidas del compuesto activo o compuestos activos, que el sujeto inhala. El compuesto activo se puede aerosolizar en una variedad de formas, tal como, pero no limitado a, inhalantes de polvo seco, inhalantes de dosis medida, o suspensiones líquido/líquido. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas pueden contener opcionalmente otros ingredientes terapéuticos tal 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 la Patente Estadounidense No. 4,501,729.

30 La composición farmacéutica particulada se puede combinar opcionalmente con un portador para ayudar en la dispersión o el transporte. Se puede mezclar un portador adecuado tal como un azúcar (es decir, lactosa, sacarosa, trehalosa, manitol) con el compuesto o compuestos activos en cualquier relación adecuada (por ejemplo, una relación de 1 a 1 en peso).

Las partículas comprendidas del 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 luego de inhalación y en los bronquios y alveolos de los pulmones. En general, son respirables las partículas varían de aproximadamente 1 a 10 micras de tamaño (más particularmente, menos de aproximadamente 5 micras de tamaño). Las partículas de tamaño no respirable que se incluyen en el aerosol se tienden a depositar en la garganta y se tragan, y la cantidad de partículas no respirables en el aerosol se minimiza preferiblemente. Para administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula en el rango de 10-500 uM para asegurar la retención en la cavidad nasal.

Las composiciones farmacéuticas líquidas del compuesto activo para producir un aerosol se pueden preparar al combinar el compuesto activo con un vehículo adecuado, tal como agua libre de pirógeno estéril. Las soluciones salinas hipertónicas utilizadas son preferiblemente soluciones libres de pirógeno, estériles, 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.

Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto activo se pueden producir mediante cualesquier medios adecuados, tal como con un nebulizador a chorro impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,501,729. Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman soluciones o suspensiones del ingrediente activo en un rocío de aerosol terapéutico por medio de aceleración de gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un orificio venturi angosto o por medio de agitación ultrasónica.

Las formulaciones adecuadas para uso en nebulizadores consisten del ingrediente activo en un portador líquido, el ingrediente activo que comprende hasta 40 % p/p de la formulación, pero preferiblemente menos de 20 % p/p. El portador es normalmente agua (y más preferiblemente agua libre de pirógenos, estéril) o una solución alcohólica

acuosa diluida, preferiblemente hecha isotónica, pero puede ser hipertónica con fluidos corporales mediante de la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se hace estéril, por ejemplo, metil hidroxibenzoato, antioxidantes, agentes aromatizantes, aceites volátiles, agentes reguladores y tensoactivos.

5 Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto activo se pueden producir de otra forma con cualquier generador de aerosol de particulado sólido. Los generadores de aerosol para administrar terapéuticos
 10 particulados sólidos a un sujeto producen partículas que son respirables y generan un volumen de aerosol que contienen una dosis medida predeterminada de un terapéutico en un índice adecuado para administración a un humano. Un tipo ilustrativo de generador en aerosol particulado sólido es un insuflador. Las formulaciones
 15 adecuadas para administración mediante insuflación incluyen polvos finamente desmenuzados que se pueden suministrar por medio de un insuflador o puestos 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 aquí) está contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente hechos de gelatina o plástico, que se perforan o se abren in situ y el polvo suministrado por aire aspirado a través del dispositivo luego de inhalación o por medio de una bomba operada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste únicamente del ingrediente activo o de una mezcla de polvo que comprende el ingrediente activo, un diluyente de polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensoactivo opcional. El ingrediente activo normalmente comprende de 0.1 a 100 p/p de la formulación.

Un segundo tipo de generador en aerosol ilustrativo comprende un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de
 20 dosis medida son dispensadores en aerosol presurizados, normalmente que contienen una formulación de suspensión o solución del ingrediente activo en un propulsor licuificado. Durante el uso estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido, normalmente de 10 a 200 ul, para producir un rociador de partícula fino que contiene el ingrediente activo. Los propulsores adecuados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más co-
 25 solventes, por ejemplo, etanol, tensoactivos, tal como ácido oleico o trioleato de sorbitan, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.

Se puede incorporar un agente de iARN en las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una o más especies de un agente de iARN y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí la frase "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir
 30 cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las
 35 composiciones.

Se puede proporcionar administración por el sujeto o por otra persona, por ejemplo, un cuidador. Un cuidador puede ser cualquier entidad involucrada con el suministro de cuidado al humano: por ejemplo, un hospital, hospicio, consultorio médico, clínica ambulatoria; un trabajador de la salud tal como un médico, una enfermera u otro profesional; o un cónyuge o tutor, tal como un familiar. Se puede proporcionar el medicamento en dosis medidas o
 40 en un dispensador que suministra una dosis medida.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" es la cantidad presente en la composición que se necesita para proporcionar el nivel deseado de fármaco en el sujeto que se va a tratar para dar la respuesta fisiológica anticipada.

El término "cantidad fisiológicamente aceptable" es aquella cantidad suministrada a un sujeto para proporcionar el efecto paliativo o curativo deseado.

45 El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa que el portador se puede colocar en los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos en los mismos.

El término "co-administración" se refiere a administrar a un sujeto dos o más agentes, y en particular dos o más agentes de iARN. Los agentes pueden estar contenidos en una única composición farmacéutica y ser administrados al mismo tiempo o los agentes pueden estar contenidos en una formulación separada y administrada en serie a un
 50 sujeto. Siempre y cuando se puedan detectar los dos agentes en el sujeto al mismo tiempo, se dice que los dos agentes se van a coadministrar.

Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portadores incluyen estabilizadores tales como albúmina de suero humano (HSA), agentes de volumen tales como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; ajustadores o reguladores de pH; sales tales como cloruro de sodio; y similares. Estos portadores pueden estar en una forma
 55 cristalina o amorfa o pueden ser una mezcla de las dos.

Los agentes de volumen que son particularmente valiosos incluyen carbohidratos compatibles, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones de los mismos. Los carbohidratos adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-.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 incluyen aspartamo. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, siendo preferida la glicina.

Los ajustadores o reguladores de pH adecuados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de bases y ácidos orgánicos, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, y similares; se prefiere citrato de sodio.

10 Dosificación

Se puede administrar un agente de iARN en una dosis menor de aproximadamente 75 mg 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 menor de 200 nmol de agente de iARN (por ejemplo, aproximadamente 4.4×10^{16} copias) por kg de peso corporal, o menor de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15, 0.075, 0.015, 0.0075, 0.0015, 0.00075, 0.00015 nmol de agente de iARN por kg de peso corporal. La dosis unitaria, por ejemplo, se puede administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o intramuscular, intratecalmente, o directamente en un órgano), una dosis inhalada, o una aplicación tópica.

La dosificación puede ser una cantidad efectiva para tratar o evitar una enfermedad o trastorno. Se puede proporcionar profilácticamente o como el principal o una parte de un protocolo de tratamiento.

En una realización, la dosis unitaria se administra menos frecuentemente de una vez al día, por ejemplo, menos de cada 2, 4, 8 o 30 días. En otra realización, la dosis unitaria no se administra con una frecuencia (por ejemplo, no una frecuencia regular). Por ejemplo, se puede administrar la dosis unitaria una única vez. En razón a que el agente de iARN mediado por inactivación puede persistir durante varios días después de administrar la composición de agente de iARN, en muchos casos, es posible administrar la composición con una frecuencia de menos de una vez por día, o, para algunos casos, solo una vez para el régimen terapéutico completo.

En una realización, se administra a un sujeto una dosis inicial de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de doble cadena de iARN, o agente de siARN, (por ejemplo, un precursor, por ejemplo, un agente de iARN más grande que se puede procesar en un agente de siARN, o un ADN que codifica un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN de doble cadena, o agente de siARN, o precursor del mismo). La dosis o dosis de mantenimiento son generalmente menores que la dosis inicial, por ejemplo, menos de la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir tratar el sujeto con una dosis o dosis que varían 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. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente no más de una vez cada 5, 10, o 30 días. Adicionalmente, el régimen de tratamiento puede durar un periodo de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, su severidad y la condición general del paciente. En las realizaciones preferidas se puede suministrar la dosificación 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 u 8 días. Luego de tratamiento, se puede monitorear al paciente para cambios en su condición y para el alivio de los síntomas del estado de la enfermedad. La dosificación del compuesto se puede aumentar en el evento en que el paciente no responda de forma significativa a los niveles de dosificación actuales, o se puede reducir la dosis si se observa un alivio de los síntomas del estado de la enfermedad, si ha disminuido el estado de la enfermedad o si se observan efectos secundarios no deseados.

Se puede administrar la dosis efectiva en una dosis única o en dos o más dosis, según se desee o se considere apropiado en las circunstancias específicas. Si se desea facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, puede ser aconsejable la implantación de un dispositivo de administración, por ejemplo, una bomba, endoprótesis semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular), o reservorio.

Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de enfermedad, en donde el compuesto se administra en dosis de mantenimiento, que varían desde 0.001 g hasta 100 g por kg de peso corporal (véase documento US 6,107,094).

La concentración de la composición de agente de iARN es una cantidad suficiente para que sea efectiva en tratar o evitar un trastorno o para regular una condición fisiológica en los humanos. La concentración o cantidad de agente de iARN administrada dependerá de los parámetros determinados para el agente y el método de administración, por ejemplo, nasal, bucal o pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones nasales tienden a requerir concentraciones mucho más bajas de algunos ingredientes con el fin de evitar la irritación o ardor de los pasajes nasales. A veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces con el fin de proporcionar una formulación nasal adecuada.

5 Ciertos factores pueden influir la dosificación requerida para tratar efectivamente un sujeto, que incluyen pero no se limitan a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. También se apreciará que la dosificación efectiva de un agente iARN tal como un siARN 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 a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, se puede monitorear el sujeto después de administrar una composición de agente de iARN. Con base en la información del monitoreo, se puede administrar una cantidad adicional de la composición de agente de iARN.

10 La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta de la condición de la enfermedad que se va a tratar, con el curso de tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado de enfermedad. Se pueden calcular programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las personas medianamente versadas pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación e índices de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, y de manera general se pueden estimar sobre la base de los EC50 encontrados por ser efectivos en modelos animales in vitro e in vivo como se describió anteriormente. Los agentes de iARN como se describe aquí pueden ser útiles en el tratamiento y (cuando sea apropiado) en la prevención de una cualquiera de las siguientes enfermedades/trastornos, fibrosis quística, síndrome de Liddles, insuficiencia renal, hipertensión, desequilibrios de electrolitos.

En particular, en algunas realizaciones, los agentes de iARN se pueden utilizar para tratar y/o evitar manifestaciones clínicas adversas de estas enfermedades/trastornos.

20 La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes.

EJEMPLOS

Fuente de los reactivos

25 Cuando la fuente de un reactivo no se proporciona específicamente aquí, dichos reactivos se pueden obtener a partir de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en un estándar de calidad/pureza para su aplicación en biología molecular.

Ejemplo 1: Selección de secuencias

30 Con el fin de identificar siARN terapéuticos para modular en forma descendente la expresión de la subunidad alfa del canal de sodio epitelial ENaC (α -ENaC), se definen los grupos de detección con base en un análisis bioinformático. Los factores clave para el diseño del grupo de detección tienen especificidad predicha de los siARN contra el transcriptoma de las especies pertinentes. Para la identificación de siARN alfa-ENaC y un sistema de entrega eficiente se utiliza un método de tres vertientes: se seleccionan ratas como la especie de prueba para impulsar la eficacia de la inactivación in vivo después de suministro intratraqueal, se seleccionan conejillos de indias como el organismo modelo de la enfermedad para demostrar que la reducción de mARN alfa-ENaC resulta en un efecto funcional medible. La molécula de siARN terapéutica tiene que objetivar el alfa-ENaC humano, así como también la secuencia alfa-ENaC de por lo menos una especie toxicología importante, en este caso, macaco de la india.

35 El análisis inicial de la secuencia de mARN alfa-ENaC importante revela pocas secuencias que se pueden identificar que cumplen los requerimientos de especificidad y al mismo tiempo el mARN alfa-ENaC objetivo en todas las especies pertinentes. Por lo tanto, se decide diseñar grupos de detección independientes para el siARN terapéutico y para las moléculas sustitutas que se van a probar en el modelo de enfermedad relevante (Tablas 1A, 1B, 1C y 1D).

40 Todos los siARN reconocen la secuencia de alfa-ENaC humana, cuando se selecciona un sistema de cultivo de células humanas para determinación de la actividad in vitro (H441, véase adelante). Por lo tanto todos los siARN se pueden utilizar para objetivar el mARN alfa-ENaC humano en una configuración terapéutica.

Se diseñan los grupos de detección terapéuticos para contener sólo las secuencias de siARN que son totalmente complementarias a las secuencias alfa- ENaC humanas y de macaco de la india.

45 Diseño y selección in silico de siARN que dirige alfa- ENaC (SCNN1A)

Se lleva a cabo e diseño de siARN para identificar siARN para los cuatro grupos previamente definidos (véase anteriormente)

a) "grupo de detección inicial"

- b) "grupo de detección extendida"
- c) "Grupo sustituto in vivo de rata"
- d) "Grupo sustituto in vivo de conejillo de indias"

Grupo de detección inicial

5 El objetivo de la selección in silico de un grupo de detección inicial es identificar los siARN que objetivan específicamente el alfa-ENaC humano, así como también su ortólogo de macaco de la india. El mARNm objetivo humano (NM_001038.4) se descarga de los recursos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) durante el procedimiento de selección de siARN completo. Con el fin de identificar el ortólogo alfa- ENaC macaco de la india (Macaca mulatta), se utiliza la
10 secuencia humana en una búsqueda blastn en el Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Mmulatta>) contra Mmulatta contigs desde el 2004 10 01. Todas las regiones de acierto se extraen y montan por la herramienta de montaje CAP para generar una primera secuencia de montaje. Adicionalmente, se realiza una búsqueda BLAST con la secuencia humana en UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Rhesus&db=rheMac2&hgsid=84859356>) contra macaco de la india congelado 12 de marzo 2005. El acierto de andamio 84554 se descarga y utiliza junto con la primera secuencia de montaje por CAP para generar la secuencia de consenso final para alfa-ENaC de macaco de la india.

Luego de la extracción de todas las secuencias superpuestas 19mero fuera del mARN humano, se identifican 19meros conservados que tienen secuencias idénticas en la secuencia de consenso ensamblada de macaco de la india. Esas secuencias de 19mero se definen como el grupo de secuencias de siARN con reactividad cruzada de macaco de la india-humano (sentido), representado por 1185 19meros.

Las secuencias antisentido correspondientes se generan y prueban para especificidad en humanos. Por esto, su potencial predicho para interactuar con los mARN objetivo irrelevantes (fuera de objetivos potenciales) se toma como parámetro. Las secuencias con bajo potencial fuera de objetivo se definen como preferibles y se predice que son más específicas.

Para una selección adicional, los siARN candidatos se clasifican de acuerdo con su potencial predicho para interactuar con otras secuencias anfitrionas (aquí, sin limitación, humanas). Se asume que los siARN con bajo potencial fuera de objetivo son más específicos in vivo. Para predecir el potencial fuera de objetivo específico de siARN, se hacen los siguientes supuestos:

30 1) se puede deducir el potencial fuera de objetivo de una cadena a partir del número y distribución de los emparejamientos incorrectos para un fuera de objetivo

2) el fuera de objetivo más importante, es decir el gen que se predice tiene la probabilidad más alta de ser inactivado debido a la tolerancia de los emparejamientos incorrectos, determina el potencial fuera de objetivo de la cadena

35 3) las posiciones 2 a 9 (conteo de 5' hasta 3') de una cadena (región semilla) pueden contribuir más al potencial fuera de objetivo que el resto de la secuencia (es decir, región del sitio de división y sin semilla) (Haley, B., and Zamore, P.D., Nat Struct Mol Biol. 2004, 11:599).

4) las posiciones 10 y 11 (contando 5' a 3') de una cadena (región de sitio de división) pueden contribuir más al potencial fuera de objetivo que la región sin semilla (es decir las posiciones 12 a 18, contando 5' a 3')

5) las posiciones 1 y 19 de cada cadena no son relevantes para interacciones fuera de objetivo

40 6) el potencial fuera de objetivo se puede expresar por la clasificación fuera de objetivo de los fuera de objetivo más relevantes, calculado con base en el número y posición de los emparejamientos incorrectos de la cadena a la región más homóloga en el gen fuera de objetivo considerando los supuestos 3 a 5

7) asumir el aborto potencial de la actividad de sentido de cadena mediante modificaciones internas introducidas, sólo será relevante el potencial fuera de objetivo de la cadena antisentido

45 Para identificar genes potencial fuera de objetivos, las secuencias antisentido 19mero se someten a una búsqueda de homología en contra de las secuencias de mARN humanas disponibles para el público, que se supone representan el transcriptoma comprensivo humano.

5 Para este propósito, las búsquedas fastA (versión 3.4) se realizan con todas las secuencias 19mero contra una base de datos RefSeq humana (disponible la versión de ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/ el 18 de noviembre, 2005). La búsqueda FastA se ejecuta con los parámetros de valores pares - 30 f - g 30 con el fin de tener en cuenta la homología sobre la longitud completa de la 19mero sin espacios. Adicionalmente, con el fin de asegurar el listado de todos los aciertos fuera de objetivo pertinentes en el archivo de salida fastA se utiliza el parámetro E - 15000.

La búsqueda da como resultado una lista de potenciales fuera de objetivo de cada secuencia de entrada enumerados por homología de secuencia descendente sobre la 19mero completa.

10 Para clasificar los potenciales fuera de objetivo de acuerdo con los supuestos 3 a 5, y con esto identificar el gen fuera de objetivo más relevante y su clasificación fuera de objetivo, los archivos de salida fastA se analizan mediante una secuencia de comandos perl.

La secuencia de comandos extrae las siguientes propiedades fuera de objetivo para cada secuencia de entrada 19mero y cada gen fuera del objetivo para calcular la clasificación fuera de objetivo:

Número de emparejamientos incorrectos en región sin semilla

Número de emparejamientos incorrectos en región semilla

15 Número de emparejamientos incorrectos en la región del sitio de división

La calificación fuera de objetivo se calcula al considerar los supuestos de 3 a 5 como sigue:

Calificación fuera de objetivo = número de emparejamientos incorrectos de semilla * 10
 + número de emparejamientos incorrectos de sitio de división * 1.2
 + número de emparejamientos incorrectos sin semilla * 1,

20 El gen fuera de objetivo más relevante para cada secuencia de 19mero se define como el gen con la calificación fuera de objetivo más baja. De acuerdo con lo anterior, la calificación fuera de objetivo más baja se define como representativa para el potencial fuera de objetivo de cada siARN, representado por la secuencia antisentido 19mero analizada.

El potencial fuera de objetivo calculado se utiliza como parámetro de clasificación (descendente por calificación fuera de objetivo) con el fin de generar una clasificación para todas las secuencias de siARN con reactividad cruzada de macaco de la india-humano.

25 Una calificación fuera de objetivo de 3 o más se define como requisito previo para la selección de siARN, mientras que se excluyen todas las secuencias que contienen 4 o más G en una fila (secuencias poli-G), lo que lleva a selección de un total de 152 siARN que objetivan ENAC alfa de humano y de macaco de la india (véase Tabla 1a).

Grupo de detección extendida

30 El objetivo de la selección in silico del grupo de detección extendida es identificar todos los siARN que se dirigen a alfa- ENaC humano adicionales con suficiente especificidad, que se excluyen del grupo inicial debido a la falta de reactividad cruzada con macaco de la india. Se toman las secuencias restantes del grupo de 19meros derivadas de alfa- ENaC que no se han analizado anteriormente y se generan las secuencias antisentido correspondientes. El gen fuera de objetivo más relevante y sus calificaciones fuera de objetivo correspondientes se calculan como se describe en la sección "Grupo de detección inicial".

35 Para determinar la reactividad cruzada para el ratón y conejillo de indias (*Cavia porcellus/cobya*), las secuencias alfa- ENaC de estas especies se descargan de la base de datos de nucleótidos NCBI 1 (números de acceso NM_011324.1 y AF071230 (longitud completa)/DQ109811 (cds parcial), respectivamente). Las dos secuencias del conejillo de Indias se utilizan para generar una secuencia de consenso alfa-ENaC de conejillo de Indias. Se prueba cada secuencia de 19mero humana para presencia en las secuencias de ratón y conejillo de Indias. Las secuencias positivas se asignan al grupo de secuencias de siARN de reacción cruzada humano-ratón (sentido), o secuencias de siARN de reacción cruzada humano-conejillo de indias (sentido). Después de la exclusión de todas las secuencias de poli-G, las secuencias se seleccionan con calificaciones de fuera de objetivo de 3 o más, así como también aquellas con calificaciones fuera de objetivo de 2.2 o 2.4 y reactividad cruzada a ratón, macaco de la india o conejillo de indias. El número total de siARN en el grupo de detección extendida es 344 (véase Tabla 1b).

Grupo sustituto in vivo de rata

El objetivo de la selección in silico del grupo sustituto in vivo de rata es identificar todos los siARN que objetivan alfa-ENaC humano y de rata con suficiente especificidad en rata. Para la identificación de siARN de reacción cruzada humano-rata, la secuencia de mRNA de alfa-ENaC de rata se descarga de la base de datos de nucleótidos NCBI (número de acceso, NM_031548.2), y se prueban todas las secuencias fuera del grupo de 19mers humanos para presencia en la secuencia de la rata, que representa el grupo de secuencias de siARN de reacción cruzada humano-rata (sentido).

Se generan las secuencias antisentido correspondientes y se ensayan para especificidad en rata. Para ello, el gen fuera de objetivo más importante, en la rata y sus calificaciones fuera de objetivo correspondientes se calculan como se describe en la sección "Grupo de detección inicial" utilizando el grupo de mRNA de rata (base de datos RefSeq) en lugar de las transcripciones humanas. Después de la exclusión de todas las secuencias de poli-G, se genera una clasificación que considera la calificación fuera de objetivo de rata en primera prioridad y la calificación fuera de objetivo humano en segunda prioridad. Se seleccionan finalmente aquellas 48 secuencias de la parte superior de la lista que representan el grupo sustituto in vivo de rata (véase Tabla 1c).

Grupo sustituto de conejillo de Indias in vivo

El objetivo de la selección in silico del grupo sustituto de conejillo de Indias in vivo es identificar todos los siARN que objetivan alfa-ENaC de humano y conejillo de Indias que no se han seleccionado en los grupos anteriores. Los siARN restantes del grupo determinado previamente de secuencias de siARN reacción cruzada de humano-conejillo de indias (sentido) se clasifican de acuerdo a las calificaciones fuera de objetivo de humano. Se seleccionan las mejores 63 secuencias (que excluyen las secuencias poli-G), que representan el grupo sustituto de conejillo de Indias in vivo (ver Tabla 1d).

Ejemplo 2: Síntesis de siARN

Síntesis de nucleótidos que comprenden bases naturales

Como los siARN de los grupos de detección son todos potencialmente destinados para administración in vivo, se sintetizan siARN con una estrategia de modificación que protege los siARN de la degradación por endo-y exonucleasas en un ambiente biológico. En esta estrategia, los extremos 3' de ambas cadenas se protegen de una actividad 3' -> 5' exonucleotídica mediante un enlace de fosforotioato entre las dos últimas nucleobases en el extremo 3'. Con el fin de inhibir la degradación de endo-nucleolítica de siARN se reemplazan todas las pirimidinas en la cadena sentido del siARN con el ribonucleótido modificado 2'-O-metil correspondiente. Para reducir el número de modificaciones en la cadena antisentido, que es la cadena más activa y por lo tanto más sensible a modificaciones, sólo modificamos las pirimidinas en el contexto de los sitios de división de nucleasa principales identificados previamente con los grupos 2'-O-metilo. Los sitios de división principales son los siguientes dos motivos de secuencia: 5'-UA-3' y 5'-CA-3'.

Ya que también se ha considerado utilizar siARN en formulaciones que potencialmente protegen los ARN del ambiente biológico nucleolítico en el pulmón, también se sintetiza el mismo grupo de siARN y sin ninguna protección de la degradación endonucleolítica.

Mientras que la fuente de un reactivo no se da específicamente aquí, dicho reactivo se puede obtener de cualquier proveedor de reactivos para la biología molecular en un estándar de calidad/pureza para aplicación en la biología molecular.

Los ARN de cadena simple se producen mediante síntesis en fase sólida en una escala de 1 mmol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. El ARN y ARN que contienen nucleótidos 2'-O-metilo se generan mediante síntesis en fase sólida que emplea las fosforamiditas correspondientes y fosforamiditas 2'-O-metilo, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Estos bloques de construcción se incorporan en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena de oligorribonucleótidos utilizando química de fosforamidita de nucleósido estándar, descrita en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Se introducen enlaces de fosforotioato mediante el reemplazo de la solución oxidante de yodo con una solución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, Reino Unido) en acetonitrilo (1%). Se obtienen reactivos auxiliares adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

La desprotección y purificación de los oligo-ribonucleótidos crudos mediante HPLC de intercambio aniónico se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos establecidos. Los rendimientos y las concentraciones se determinan mediante absorción UV de una solución de los respectivos ARN en una longitud de onda de 260 nm utilizando un

5 fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se genera ARN de doble cadena al mezclar una solución equimolar de cadenas complementarias en regulador de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8, cloruro de sodio 100 mM), se calienta en un baño de agua a 85-90° C durante 3 minutos y se enfría hasta temperatura ambiente durante un periodo de 3 a 4 horas. La solución de ARN hibridada se diluye a una concentración de 50 µmoles de doble cadena ARN/L y se almacena a -20° C hasta uso.

Ejemplo 3: prueba siARN in vitro

10 La capacidad de los agentes de iARN para inhibir la expresión de alfa-ENaC se prueba en estirpes celulares humanas in vitro, o in vivo en ratas. El agente de iARN se transfecta en las células, por ejemplo, mediante transfección, se deja actuar en las células durante un tiempo determinado, por ejemplo, 24 horas, y se determinan los niveles de mRNA de alfa-ENaC mediante análisis de ADN ramificado. Alternativamente, el agente de iARN se administra in vivo a través de la ruta intratraqueal y la inhibición de la expresión mRNA alfa-ENaC se determina mediante análisis de ADN ramificado en el órgano objetivo. Complementando estos ensayos directos, hemos probado la inhibición de la expresión génica objetivo mediante agentes de iARN para el mRNA alfa-ENaC recombinante expresado en células anfitrionas de mamífero.

15 Estirpes celulares

Se obtienen células H441 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC - Número: HTB - 174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania) y se cultivan en medio RPMI 1640, 10% de suero de ternero fetal, 100 U de penicilina/100 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y piruvato de sodio 1 mM (todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania) a 37° C bajo una atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

20 Se obtienen células epiteliales bronquiales humanas primarias de Cambrex (Cat # CC- 2540) y se cultivan de forma rutinaria en medio BEGM con SingleQuots (Cambrex Cat # CC- 3170 menos tri-yodotreonina). Para polarización y crecimiento en la interfaz aire-líquido las células se cultivan en una mezcla 01:01 de BEGM: DMEM complementado con 4.5 g/L de D-glucosa (Gibco BRL Cat # 41965-039) y complementado con SingleQuots (Cambrex Cat # CC- 4175), como anteriormente pero menos la triyodotreonina y alícuotas GA1000 y en la presencia de 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL Cat # 10131-015). Como las células se mantienen en medio libre de suero, se utiliza solución de neutralización de tripsina durante las etapas de pasaje (Cambrex Cat # CC- 5002). Para la polarización y cultivo en la interfaz aire-líquido se cultivan las células en soportes de policarbonato semipermeable (0.4 micras) (Coming Costar Cat. # 3407 # 3460) y se cultivan a 37° C bajo una atmósfera 5% de CO₂/95% de aire.

30 Se cultivan células de riñón de mono verde africano Cos- 1 (ATCC # CRL - 1650) en MEM de Dulbecco, 4.5 g/L de glucosa, 10% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio (Gibco BRL), penicilina 100 U/100 µg/mL de estreptomina.

Ejemplo 3.1: Detección in vitro para determinación IC₅₀ de siARN alfa-ENaC activo en H441

35 Un día antes de transfección, se induce expresión ENaC -alfa en células H441 (ATCC - Número: HTB -174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania) al agregar 100 nM de dexametasona. Directamente antes de transfección, se siembran células a 1.5 x 10⁴ células/pozo en placas de 96 pozos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) en 75 µl de medio de crecimiento (medio RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino, 100 U de penicilina/100 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 nM y piruvato de sodio 1 mM, todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las transfecciones se realizan por cuadruplicado. Para cada pozo 0.5 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) se mezclan con 12 µL de Opti-MEM (Invitrogen) y se incuban durante 15 min hasta temperatura ambiente. Para la concentración de siARN es 50 nM en volumen de transfección de 100 µL, se mezclan 1 µL de µM de siARN 5 con 11.5 µL de Opti-MEM por pozo, combinado con la mezcla de Lipofectamine 2000-Opti-MEM y se incuban de nuevo durante 15 minutos hasta temperatura ambiente. Se aplican completamente complejos de siARN-Lipofectamine 2000 (25 µL cada uno por pozo) a las células y estas se incuban durante 24 horas a 37° C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau).

45 Se cosechan las células al aplicar 50 µL de mezcla de lisis (contenido del kit de QuantiGene DNA de Genospectra, Fremont, EE.UU.) a cada pozo que contenía 100 µL de medio de crecimiento y se lisan a 53° C durante 30 min. Posteriormente, 50 µL de los lisados se incuban con grupos de sonda específicos para ENaC-alfa humano y GAPDH humano (véase adelante secuencia de mediciones de sonda) y se procede de acuerdo con el protocolo del fabricante para QuantiGene. Al final se mide la quimioluminiscencia en una Luz Victor2 (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como RLU (unidades de luz relativas) y los valores obtenidos con las mediciones de sonda hENaC se normalizan a los valores de GAPDH respectivos para cada pozo. Los valores obtenidos con los siARN dirigidos contra ENaC-alfa se relacionan con el valor obtenido con un siARN no específico (dirigido contra el HCV), que se establece en 100%. La expresión residual en porcentaje de alfa-ENaC para ejemplos de siARN se muestra en las Tablas 1A- 1D.

ES 2 432 532 T3

5 Los siARN efectivos de la detección se caracterizan adicionalmente por las curvas de respuesta de dosis. Las transfecciones de curvas de respuesta de dosis se realizan en las siguientes concentraciones: 100 nM, 16.7 nM, 2.8 nM, 0.46 nM, 77 picoM, 12.8 picoM, 2.1 picoM, 0.35 picoM, 59.5 fM, 9.9 fM y se simula (sin siARN) y se diluyen con Opti-MEM a una concentración final de 12.5 µL de acuerdo con el protocolo anterior. El análisis de datos se realiza utilizando Microsoft Excel con el software XL -fit 4.2 incorporado (IDBS, Guildford, Surrey, Reino Unido) y aplicando el número de modelo sigmoidal 606.

Grupos de sonda:

alfa- ENaC humano:

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hENAC001	.235.255.CE	CE	gtctgtccagggttctctccTTTTctcttgaaagaaagt	1645
hENAC002	.274.293.CE	CE	actgccattcttggtcagTTTTctcttgaaagaaagt	1646
hENAC003	.344.367.CE	CE	ctctctggaagcaggaggaataTTTTctcttgaaagaaagt	1647
hENAC004	.391.411.CE	CE	gccgcgatagaagatgtagTTTTctcttgaaagaaagt	1648
hENAC005	.501.521.CE	CE	gcacttggtgaaacagcccagTTTTctcttgaaagaaagt	1649
hENAC006	.539.560.CE	CE	agcagagagctgtagctggtcTTTTctcttgaaagaaagt	1650
hENAC007	.256.273.LE	LE	cgccataatcgcccccTTTTagcataggaccctgtct	1651
hENAC008	.368.390.LE	LE	cacagccacactcttgatcatgTTTTagcataggaccctgtct	1652
hENAC009	.412.431.LE	LE	acagtactccacgttctggTTTTagcataggaccctgtct	1653
hENAC010	.455.477.LE	LE	ggagcttatagtagcagtagccccTTTTagcataggaccctgtct	1654
hENAC011	.522.538.LE	LE	acgctgcatggtccgTTTTagcataggaccctgtct	1655
hENAC012	.561.580.LE	LE	gaggccatcgtgagtaaccTTTTagcataggaccctgtct	1656
hENAC013	.214.234.BL	BL	Tcatgctgatggaggtctcca	1657
hENAC014	.294.318.BL	BL	Ggtaaaggtctcaacaggaacatc	1658
hENAC015	.319.343.BL	BL	Cacactgctgtgtacttgaag	1659
hENAC016	.432.454.BL	BL	Caggaactgtgcttctgtagtc	1660
hENAC017	.478.500.BL	BL	Gtggctgaggagaagtcaacct	1661
hENAC018	.581.599.BL	BL	Ccattctgggatgtcacc	1662

GAPDH humano:

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hGAP001	AF261085.252.271.CE	CE	gaattgccatgggtgaaTTTTctcttgaaagaaagt	1663
hGAP002	AF261085.333.352.CE	CE	ggaggatctcgctcctggaTTTTctcttgaaagaaagt	1664

(continuación)

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
hGAP003	AF261085.413.431.CE	CE	ccccagccttctccatggtTTTTTctcttgaaagaaagt	1665
hGAP004	AF261085.432.450.CE	CE	gctccccctgcaaatgagTTTTTctcttgaaagaaagt	1666
hGAP005	AF261085.272.289.LE	LE	agccttgacggtgccatgTTTTTaggcataggaccggtgtct	1667
hGAP006	AF261085.290.310.LE	LE	gatgacaagcttcccgttctTTTTTaggcataggaccggtgtct	1668
hGAP007	AF261085.311.332.LE	LE	agatggtgatggattccattTTTTTaggcataggaccggtgtct	1669
hGAP008	AF261085.353.372.LE	LE	gcatgcccccacttgattttTTTTTaggcataggaccggtgtct	1670
hGAP009	AF261085.373.391.LE	LE	cacgagctactcagcgccaTTTTTaggcataggaccggtgtct	1671
hGAP010	AF261085.451.472.LE	LE	ggcagagatgatgaccctttgTTTTTaggcataggaccggtgtct	1672
hGAP011	AF261085.392.412.BL	BL	Ggtgaagacgccagtggactc	1673

Los IC₅₀ para los ejemplos de siARN se muestran en la Tabla 2A y 2B.

Ejemplo 3.2: Atenuación alfa-ENaC transitoria en un modelo de epitelio bronquial humano primario:

5 Se colocan en placas células epiteliales bronquiales humanas (referencia de donante 4F1499) en placas de 24 pozos a 1×10^5 células por pozo en 0.5 mL de medio de crecimiento un día antes de transfección. Las células son 70% confluentes en el día de transfección de siARN.

10 Cada siARN se vuelve a suspender en 100 nM en 1 mL de Optimem I (Invitrogen) y en un tubo separado, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) se diluye hasta 6 µL/mL en Optimem, dando una cantidad suficiente para la transfección de cuatro repeticiones en una placa de 24 pozos. Después de 5 minutos hasta temperatura ambiente, las mezclas se combinan para dar la concentración final deseada de siARN 50 nM y 3 µL/mL de Lipofectamine 2000. La mezcla de transfección se incuba durante otros 20 minutos hasta temperatura ambiente y 420 µL del complejo de siARN/reactivo se agrega a cada pozo según lo dictado por el diseño experimental. Las placas se agitan suavemente para asegurar la mezcla completa y después se incuban a 37° C en un incubador a 5% de CO₂/95% de aire durante 4 horas. Posteriormente, la mezcla de transfección se aspiró y las células se vuelven a las condiciones normales de cultivo durante 20 horas adicionales.

20 Se preparan lisados celulares para el análisis de ADN ramificado. Se prepara una mezcla de medio: regulador de lisis 2:1 (Panomics) y se lisan las células en 200 µL a 53° C durante 30 minutos. Después de una comprobación visual para la lisis completa, los lisados celulares se almacenan a -80° C para posterior análisis. El análisis de ADN ramificado se realiza como se describió 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 µL de la muestra se aplica a cada pozo en este caso.

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

Ejemplo 3.3: Inhibición in vitro de expresión génica alfa-EnaC de macaco de java de la india clonada expresada exógenamente para agentes iARN seleccionados en células Cos-1

25 Clonación de la secuencia alfa-ENaC de macaco de java

Secuencias de cebadores para amplificación de 5' -UTR y CDS (los nucleótidos mostrados en paréntesis corresponden a secuencias de cADN α-ENaC de Macaca mulatta (macaco de la india).):

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

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 de cebador para amplificación de CDS y 3'-UTR:

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

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

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

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

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

10 Se compra ARN total pulmonar de macaco de java (*Macaca fascicularis*) (# R1534152-Cy-BC) de Biocat (Alemania). La síntesis de cADN se realiza utilizando el Sistema de Síntesis de Primera Cadena SuperScript III (Invitrogen). La síntesis de cADN se realiza utilizando ya sea hexámeros aleatorios o cebadores oligo dT. Adicionalmente, el ADNc de primera cadena de pulmón de macaco de java también se compra de Biocat/# C1534160-Cy-BC). Para amplificación por PCR, se utiliza el kit PCR Advantage 2 (# K1910-1, Clontech). La amplificación de 5'-UTR y partes de los CDS se realiza utilizando P745 y una mezcla equimolar de P733, P734 y P735. Para la amplificación por PCR de los CDS y 3'-UTR, se utilizan cebadores P737 y P740. Se utilizan cebadores P713 y P715 para la amplificación de partes de los CDS.

20 Todos los productos de PCR se analizan por electroforesis en gel de agarosa y luego se clonan en el vector pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) en bacterias TOP10. Los clones luego se recogen y se aísla el ADN utilizando el kit de Miniprep Qiagen. Después de digestión de restricción de enzima con EcoRI y el análisis por electroforesis en gel de agarosa, el ADN de los clones correctos se somete a secuenciación.

25 Las secuencias luego se alinean con la secuencia de cADN de α -ENaC de macaco de la india, y las secuencias de los clones individuales se alinean entre sí. El cADN alfa-ENaC de macaco de java de longitud completa luego se clona mediante digestión de la parte 5' (5'-UTR y CDS, clon 55) con EcoR I y Not I, la digestión de la parte media del CDS por Not I y BstE II (clon 15), y la parte 3' (CDS y 3'-UTR) por BstE II y EcoR V (clon 80). Los fragmentos de ADN digeridos luego se clonan en pcADN3.1, digerido con EcoR I y EcoR V. El cADN alfa-ENaC de macaco de java de longitud completa en pcDNA3.1 luego, se somete a secuenciación de longitud completa (Ingenetix, Viena, Austria). La secuencia de cADN alfa-ENaC de macaco de java corresponde a los nt 28 a 3113 de la secuencia cADN alfa-ENaC de macaco de la india. Por último, el cADN alfa-ENaC cinomolgo luego se extirpa de alfa-ENaC de macaco de java de pcDNA3.1 mediante digestión con BamH I y EcoR V y se subclona en el vector de pXOON. El mapa del plásmido se ilustra en la Figura 1. La Figura 2 representa la secuencia de proteína (SEQ.I.D.NO: 1681) y ADN (SEQ.I.D.NO: 1682) de alfa-ENaC de macaco de java.

Transfecciones:

35 Se siembran células COS-1 a 6×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos cada una en 0.5 mL de medio de crecimiento. Un día después de la siembra las células se co-transfectan con el plásmido de expresión alfa-ENaC pXOON de macaco de java y el siARN indicado. Para cada pozo 4ng de plásmido de expresión alfa-ENaC, y 600 ng de plásmido portador (pNFAT-luc) se co-transfectan con el siARN relevante (concentración final de 45 nM) utilizando reactivo de transfección de gen X-treme (Roche) a 3.75 μ L/pozo en un volumen total de 720 μ L/pozo de Opti-MEM (Invitrogen) como se describe adelante.

40 Las transfecciones se realizan por triplicado para cada muestra. Se preparan mezclas maestras de siARN/plásmido (cada una para pozos de 3.5) como sigue: 14 ng de plásmido de expresión alfa-ENaC, 2.1 μ g de plásmido portador y 112 pmoles de siARN relevante en un volumen total de 210 μ L (Opti-MEM). Una mezcla maestra de lípidos se prepara para toda la transfección (105 μ L de lípidos más 1575 μ L de Opti-MEM para ocho muestras de transfección por triplicado). El plásmido/siARN y el lípido se mezclan en igual volumen para dar un volumen total de 420 μ L de mezcla de transfección por triplicado de la muestra (3.5 x). Luego de incubación de 20 minutos hasta temperatura ambiente, se agrega 120 μ L de la mezcla de transfección relevante a cada pozo de células en un volumen de transfección final de 720 μ L (Opti-MEM). Las células se transfectan durante 24 horas a 37° C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania) y se cosechan para el análisis de ADN ramificado.

50 Los lisados celulares se preparan para análisis de ADN ramificado. Se prepara una mezcla de medio: regulador de lisis 2:1 (Panomics) y se lisan las células en 200 μ L a 53° C durante 30 minutos. Después de una comprobación visual para la lisis completa, los lisados celulares se almacenan a -80° C para análisis posterior. El análisis de ADN

ramificado se realiza como se describió anteriormente, con expresión cino alfa-ENaC normalizada contra eGFP a partir del plásmido de expresión. El protocolo de análisis de ADN ramificado utilizado difiere del anterior solo en que 20 µL de la muestra se aplica a cada pozo en este caso.

Mediciones de sonda:

5 Alfa-ENaC de macaco de java:

Nombre FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
cyENa001	CE	cgccgtagggctgctgggTTTTctctggaaagaaagt	1683
cyENa002	CE	ggtaggagcggggaactcTTTTctctggaaagaaagt	1684
cyENa003	CE	cagaagaactcgaagagctcTTTTctctggaaagaaagt	1685
cyENa004	CE	cccagaaggccgctctcaTTTTctctggaaagaaagt	1686
cyENa005	LE	ggtgcagagccagagcactgTTTTctctggaaagaaagt	1687
cyENa006	LE	gtgccgcaggttctgggTTTTaggcataggaccggtgtct	1688
cyENa007	LE	gatcagggcctcctcctcTTTTaggcataggaccggtgtct	1689
cyENa008	LE	ccgtaggatggtggtattgtgTTTTaggcataggaccggtgtct	1690
cyENa009	LE	gcggttgctctgggagcTTTTaggcataggaccggtgtct	1691
cyENa0010	LE	ttgccagtacatcatgccaaaTTTTaggcataggaccggtgtct	1692
cyENa0011	BL	acaccaggcggatggcg	1693

eGFP:

Nombre FPL	Función	Secuencia	SEQ.I.D.NO:
EGFP001	CE	ggcacgggcagcttgcTTTTctctggaaagaaagt	1694
EGFP002	CE	ggtagcggctgaagcactgTTTTctctggaaagaaagt	1695
EGFP003	CE	cctggaocgtagcctcgggTTTTctctggaaagaaagt	1696
EGFP004	CE	cctgaagaagatggtgcgctTTTTctctggaaagaaagt	1697
EGFP005	LE	cgaacttcacctcggcgTTTTctctggaaagaaagt	1698
EGFP006	LE	cctcagctcgatgcggtTTTTctctggaaagaaagt	1699
EGFP007	LE	gtcacgagggggggccagTTTTaggcataggaccogtct	1700
EGFP008	LE	cacgccgtaggtcaggggTTTTaggcataggaccogtct	1701
EGFP009	LE	gtgctgctcatgtggtcggTTTTaggcataggaccogtct	1702
EGFP0010	LE	tcaccaggggtgcacctTTTTaggcataggaccogtct	1703
EGFP0011	BL	cggtggtgcagatgaacttca	1704
EGFP0012	BL	catggcggactgaagaagtc	1705
EGFP0013	BL	cgctcctcctgaagtcgatgc	1706

La Tabla 2C muestra la expresión alfa- ENaC en especies de macaco de java para ejemplos de siARN.

Ejemplo 3.4 Detección de inducción de interferón- α

5 Para evaluar la capacidad de siARN para estimular la liberación de interferón- α (IFN α), el siARN se incuba con las células mononucleares de sangre periférica recién purificadas (PBMC) in vitro durante 24 horas. El siARN se agrega directamente a PBMC, o primero se compleja con un agente de transfección de lípidos (Geneporter 2 o Lipofectamine 2000 o agente de transfección DOTAP) y posteriormente se incuba con PBMC. Como controles positivos para inducción de IFN α , las secuencias de control no modificados se incluyen DI_A_2216 y DI_A_5167.

DI_A_2216: es una molécula de ADN antisentido de cadena sencilla

10 5'-dGsdGsdGdGdGdAdCdGdAdTdCdGdTdCdGsdGsdGsdGsdGsdG-3' (SEQ.I.D.NO:1707)

DI_A_5167 es un siRNA conjugado con colesterol

5'-GUCAUCACACUGAAUACCAU-s-cho1-3'3'-CsAsCAGUAGUGUGACUUAUGGUUA-5' (SEQ.I.D.NO:1708)

15 Después de 24 horas, el IFN α se mide por ELISA. El nivel basal de IFN α se determina para las células no tratadas y siempre está muy cerca de un control de sólo agua. La adición de agente de transfección solo proporciona poco o ningún aumento de los niveles de IFN α . Los oligonucleótidos estimulantes conocidos se agregan a las células, ya

sea directamente o en presencia de transfectante, y se observan los aumentos esperados de IFN α . Esta configuración permite determinar la estimulación de IFN α en PBMC humano mediante siARN (u otros oligonucleótidos).

5 Aislamiento de PBMC humano: una fracción concentrada de leucocitos (capa leucocitaria) se obtiene del Banco de Sangre Suhl, Instituto de Medicina de Transfusión, Alemania. Estas células son negativas a una variedad de patógenos, incluyendo el VIH, el HCV, y otros. La capa leucocitaria se diluye 1:1 con PBS, se agrega a un tubo que contiene Ficoll, y se centrifuga durante 20 minutos a 2200 rpm para permitir el fraccionamiento. Esto se sigue por la eliminación de la capa turbia de células blancas de la sangre y se transfiere a un tubo con PBS fresco y de Ficoll, que se centrifuga durante 15 minutos a 2200 rpm. La capa turbia de células blancas de la sangre se retira de nuevo, se transfiere a medio de cultivo RPMI 1640 y se centrifuga durante 5 minutos a 1,200 rpm para sedimentar las células blancas de la sangre. Las células se vuelven a suspender en medio RPMI, se sedimentan como anteriormente, y se vuelve a suspender en medio con 10% de FCS a 1×10^6 /mL.

15 Medición de interferón- α : Las células en cultivo se combinan, ya sea con 500 nM (o 1 μ M) de oligonucleótidos en Optimem o 133 nM de oligonucleótidos en GP2 o Lipofectamine2000 o agente de transfección DOTAP durante 24 horas a 37° C. El interferón- α se mide con kit ELISA instantáneo Bender Med Systems (Viena, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La selección de secuencias terapéuticas líderes se basa en un nivel de inducción IFN α de menos de 15% del control positivo.

Ejemplo 3.5 Determinación de estabilidad de siARN en el esputo de pacientes con CF

20 Se recolectan muestras de esputo por el Dr. Ahmet Uluer, Hospital de Niños de Boston. Después de la recolección, las muestras de esputo se tratan con antibióticos y se irradian con UV para reducir el contenido bacteriano. Para determinar la estabilidad de siARN en las muestras de esputo, los siARN se incuban en 30 μ L de esputo en una concentración de 5 μ M a 37° C durante los tiempos indicados. La reacción se termina mediante adición de proteinasa K y las muestras se incuban a 42° C durante otros 20 minutos. Se agrega una molécula de ARN 40-mer hecha de L-nucleótidos ("Spiegelmer") resistente a la degradación de nucleasa y sirve como estándar de calibración. Las muestras se filtran a través de una membrana de 0.2 μ m para eliminar los residuos restantes. Las muestras se analizan por HPLC de intercambio iónico desnaturante en una columna DNAPac PA 200 (Dionex) a pH 11.0 utilizando un gradiente de perclorato de sodio para la elución. Los siARN y productos de degradación se cuantifican mediante determinación del área bajo el pico para cada muestra. La concentración se normaliza a la concentración en las muestras no incubadas.

La selección de las secuencias terapéuticas líderes (ND8356, ND8357 y ND8396) se basa en una estabilidad in vitro observada en esputo CF con una vida media de más de 60 minutos.

Ejemplo 3.6 Comprobación cruzada de secuencias terapéuticas líderes contra polimorfismos conocidos en el gen SCNN1A humano

35 Para excluir polimorfismos conocidos de los sitios de destino de los candidatos líderes, se comprueban secuencias de siARN líderes contra la base de datos polimorfismo de un solo nucleótido NCBI (SNP) (<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, ninguno se muestra por estar presente en los sitios objetivo de cualquiera de los 10 candidatos terapéuticos líderes más potentes.

40 Ejemplo 3.7: Perfil in vitro de las 5 principales secuencias fuera de objetivo predichas

Una lista de alineaciones para cada secuencia se clasifica por homología en la región 19-mer. Las secuencias fuera de objetivo se clasifican con base en el número y posición de los emparejamientos incorrectos de acuerdo con los criterios descritos en el ejemplo 1. Las 5 secuencias fuera de objetivo principales se identifican para cada una de las secuencias terapéuticas líderes (ND8356, ND8357 y ND8396). Las secuencias en y fuera de objetivo se clonan individualmente en un sistema indicador de luciferasa dual. Cada fragmento clonado abarca 19 nucleótidos objetivo, además de 10 nucleótidos que flanquean la región, en 5' y 3' de la secuencia objetivo. Los fragmentos se clonan en un sitio de clonación múltiple 3' a la secuencia de luciferasa de Renilla, bajo el control de un promotor SV40. La actividad de cada siARN contra las secuencias en y fuera de objetivo se determina mediante fluorescencia relativa de la luciferasa de Renilla objetivo de la luciferasa de luciérnaga, esta última se controla independientemente por el promotor HSV-TK. Inicialmente, se realizan transfecciones en células COS-7 a una concentración de siARN de 50 nM. Se toman lecturas de luciferasa 24 h post-transfección. En esta alta concentración de siARN, no se observa atenuación de más del 30% contra cualquier secuencia fuera de objetivo para cualquiera de los tres siARN líderes. Se demuestra la actividad contra la secuencia en objetivo con una reducción relativa en la actividad de luciferasa de Renilla de aproximadamente 80%. También se generan curvas IC50 para cada siARN contra la secuencia en

objetivo y se controlan con las secuencias fuera de objetivo identificadas anteriormente. Para cada siARN líder, el IC50 en objetivo en este ensayo indicador fue del orden de magnitud similar (10-50 pM) al IC50 obtenido contra el objetivo endógeno en H441 (Ejemplo 3.3) lo que indica que para ND8356, ND8357 y ND8396, la potencia contra la secuencia en objetivo es, por lo menos, 1000-5000 veces mayor que para cualquiera de las secuencias fuera de objetivo predichas.

Ejemplo 3.8: Perfiles de genotoxicidad

1. Determinación de la citotoxicidad: La citotoxicidad se determina al utilizar un contador de células para la evaluación del número de células de cultivo.

2. Se sabe bien que las pruebas de concentraciones citotóxicas in vitro puede inducir efectos genotóxicos, tales como la formación de micronúcleos. Por lo tanto, se considera que el aumento del número de células que contienen micronúcleos que aparecen en los conteos de células de alrededor de 50% o menos (en comparación con el control negativo en paralelo) están relacionados con la citotoxicidad si hay un aumento dependiente de dosis en las células micronucleadas ya se puede observar en concentraciones que muestran moderada toxicidad a lo sumo. El análisis de una concentración que muestra al menos el 50% de reducción en el conteo de células se requiere por las directrices que regulan ensayos de células de mamífero in vitro (directrices OECD e ICH para la conducción de las pruebas de aberración cromosómica). Adicionalmente, los protocolos de OCDE requieren pruebas de compuestos no tóxicos que incluyan por lo menos una concentración de la precipitación (siempre que no excedan 10 mM o 5 mg/ml, el que sea menor). Dado que la prueba de micronúcleos in vitro tiene por objeto predecir el resultado de los ensayos reguladores, es decir, la prueba de aberraciones cromosómicas in vitro, el protocolo para la prueba de micronúcleos in vitro se diseña para cumplir con los requisitos para estas pruebas.

3. Sistema de prueba: las células TK6 se transfectan con virus Epstein-Barr y se immortalizan las células (origen linfoblastoide humano derivada del bazo). La determinación del potencial clastogénico y/o aneugénico en la prueba de micronúcleos in vitro con células TK6 con/sin homogenato de hígado S9 (2%) de ratas macho (Aroclor 1254-pretratado). Tiempo de tratamiento: 20 h (-S9), 3 horas (+ S9). Tiempo de muestreo: 24 horas después del inicio del tratamiento de 3 horas, 48 horas después del inicio del tratamiento de 20 horas. Para cada sustancia se analizan por lo menos tres concentraciones (2 cultivos por concentración) y 2000 células por concentración.

4. El efecto de inducción de micronúcleos para una concentración probada se considera positivo si la frecuencia de células micronucleadas es

- $\geq 2\%$ y muestran por lo menos una duplicación del valor de control de solvente concurrente, o

- $< 2\%$ y muestran por lo menos un aumento de 3 veces sobre el valor de control de solvente concurrente.

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

6.

7. Resumen: Las secuencias terapéuticas líderes ND8396, ND8356, ND8357 no inducen aumento en el número de células que contienen micronúcleos después de un tratamiento de 20 horas sin activación metabólica, ni después del tratamiento de 3 horas con o sin S9. No se puede analizar la concentración citotóxica hasta el límite de las pruebas de 5 mg/ml.

Ejemplo 3.9 Eficacia funcional in vitro en H441: ND8396

Con el fin de demostrar la eficacia funcional in vitro del siARN líder contra alfa-ENaC, se transfectan células H441 con siARN y se preparan para análisis de cámara Ussings de transporte de iones. Para la transfección, las células H441 se comocan en placas en matraces T25 a 2×10^6 células por matraz de medio de cultivo complementado con dexametasona 200 nM. Las células en cada matraz se transfectan con cualquier ND8396 o un siARN de control no dirigido a siARN 30 nM y 4 mL/mL de Lipofectamine 2000 en un volumen total de 5 mL (medio libre de suero). Un día después de transfección, las células se colocan en placas en insertos Snapwell de 1 cm^2 en confluencia (2×10^5 células por inserto) para minimizar el tiempo necesario para la diferenciación y la formación de uniones estrechas y suministradas con medio en las cámaras apicales y basolaterales. Después de un día adicional de cultivo, el medio apical se elimina y se reemplaza el medio basolateral, tomando por lo tanto las células al cultivo de interfaz aire-líquido (ALI). Las células se mantienen en ALI durante otros seis días antes de análisis de transporte de ión.

8. Para el análisis funcional en cámaras Ussings, los insertos Snapwell se montan en cámaras de Difusión Verticales (Costar) y se bañan con solución de Ringer continuamente gasificada (5% de CO_2 en O_2 , pH 7.4) mantenida a 37°C que contiene: 120 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO_3 , 3.3 mM de KH_2PO_4 , 0.8 mM de K_2HPO_4 , 1.2 mM de CaCl_2 , 1.2

5 mM de MgCl₂ y 10 mM de glucosa. La osmolaridad de solución se determina en el intervalo de 280 y 300 mosmol/kg de H₂O. Las células se afianzan con voltaje a 0 mV (modelo EVC4000; WPI). La resistencia transepitelial (RT) se mide al aplicar un pulso de 1 o 2 mV a intervalos de 30 s, o utilizando la diferencia de potencial inicial a través de las células y la corriente inicial medida, y luego calcular RT por la ley de Ohm. Los datos se registran utilizando una estación de trabajo PowerLab (ADInstruments). Luego se registra el tratamiento de siARN de las características basales de las células y la corriente de corto circuito sensible a amilorida (I_{SC} luego de aplicación de 10 μM de amilorida, sólo parte apical). La actividad del canal ENaC en cada cultivo se determina por la I_{SC} sensible a amilorida en cada caso.

10 9. Después de ensayo, las células en los insertos individuales se someten a lisis para análisis de ARN. Un atenuación de 75 % en el nivel de ARN en el momento del ensayo (ND8396 en comparación con el control no dirigido) se correlaciona con una atenuación funcional de la corriente sensible a amilorida de aproximadamente 30% (ND8396 en comparación con el control no dirigido).

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

15 Tabla A: Abreviaturas de monómeros de nucleótido utilizados en la representación de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, se enlazan mutuamente por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura ^a	Nucleótidos
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. siARN seleccionados en un grupo de detección inicial (siARN reactivos cruzados de alfa ENaC de humano-macaco de la india). Se identifica un total de 152 secuencias de iARN como un grupo de detección inicial, ambos con (cadenas de secuencia 1-304) y sin (cadenas secuencia 305-608) modificaciones de estructura. Se diseñan secuencias de iARN para que sean completamente complementarias a las secuencias alfa-ENaC de macaco de la india, de acuerdo con los criterios de diseño descritos en la sección de ejemplos. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de dosis única independientes (refiérase a la sección de ejemplos para los métodos utilizados)

ID Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Anti-sentido	1ra detección de dosis única en H461; MV	SD	2da detección en H461.	SD
ND8285	1	AGCCGUAAGCGUGGCUCCCTT	2	GCAGCCACCGUACCGCCUUT	92%	4%	114%	15%
ND8286	3	CCGGUUAUGGUAGCGGCTT	4	CCCGUCCACCAUUAACCCGCTT	60%	1%	84%	4%
ND8287	5	AUGUAUCCGACACAAACAT	6	UGUUUCUCCGCAUAGCAUUT	27%	2%	35%	3%
ND8288	7	UGUAUCGCGACAGAAACAT	8	UUGUUCUUCGCGUAGCAUUT	23%	1%	32%	4%
ND8289	9	GCCGUUAUGUAUUGCCCTT	10	GGAGCAUACAUAAACGGGCTT	64%	2%	93%	8%
ND8290	11	GCCGUAGGUGGCUCCCTT	12	UGGAGCCACCGUACCGGCTT	83%	2%	115%	5%
ND8291	13	CCGMAUUAAAGAGAGCTT	14	GCUCUCUUAUUUCCGCTT	54%	2%	79%	10%
ND8292	15	CCGMAAGUCCGAAAGCCGAT	16	UCGGUUCCGAAUUCGCTT	40%	1%	54%	8%
ND8293	17	GCAUUCGGGCUUUCUUCCTT	18	GAAAAGCAGCCGAAUUCGCTT	41%	2%	51%	4%
ND8294	19	GGCGAAUUAUCUCUACUUCCTT	20	GAAUGAGAGUAUUCGCTT	19%	1%	25%	5%
ND8295	21	GCGAAUUAUCUCUACUUCCTT	22	GAAUGAGAGUAUUCGCTT	19%	5%	20%	1%
ND8296	23	AACGAGCGAAUUAUCUCCTT	24	GAGAGUAUUCGCUUUCCTT	92%	4%	115%	19%
ND8297	25	GGUAUGGUCCACGGCAGCTT	26	CUGCCGUGCCAUUAUCCCTT	79%	2%	104%	14%
ND8298	27	CUCACGAUGCCCUCCGUGCTT	28	CACCGAGGCGCAUCCGAGCTT	61%	3%	97%	14%
ND8299	29	GCUCGAAAGUUCGAAAGCTT	30	GCUUCCGAAUUCGAGCTT	16%	2%	19%	3%
ND8300	31	GCGAAUUAUCUUCUCCAGCTT	32	CCUGGAGACAGUAUCCGCTT	50%	5%	55%	5%
ND8301	33	CCGUAUCUGUUCUCCAGCTT	34	GCCUUGAGACAGUAUCCGCTT	53%	2%	65%	6%
ND8302	35	UGGUUUGGACCAUUAUUCCTT	36	AAGUAUUGUCCACAGCAUUT	19%	1%	25%	3%
ND8303	37	AACGUCUUCUCCUUAUUCCTT	38	GCAUCCAGGACAGACCGUUT	90%	3%	96%	11%
ND8304	39	UUAAUUUGGCGCUCCGCTT	40	ACGCCAGGCCCAAGUUAUUT	97%	3%	101%	11%
ND8305	41	GCUUGUUAUCUACAGAUUGCTT	42	GCCUUGGUGAGUAUCCAGCTT	73%	2%	78%	7%

ND8306	43	uuAcuAcCGAuGGccuccGfTsT	44	CGAGGCcAUcGUGAGUAATsT	91%	7%	93%	6%
ND8307	45	GAAGccGauAcuGGucuccfTsT	46	GGAGAcAGuAUOGccUUCfTsT	71%	3%	73%	6%
ND8308	47	GAuAcuGGuAcuccAGccGfTsT	48	CGGCUGGAGAcAGUAUCfTsT	86%	1%	90%	9%
ND8309	49	AuAcuGGucuccAGccGfTsT	50	UCGCCUGGAGAcAGUAUCfTsT	71%	5%	70%	8%
ND8310	51	CAAcGGuAcuccuGAUgTsT	52	CAUCAGGGAcAGACCGUUGfTsT	80%	2%	84%	9%
ND8311	53	uuuAAcuuGGccuccGfTsT	54	CGCCAGGGccAGUuuAAATsT	95%	2%	107%	15%
ND8312	55	uAcuAcAGuGGccuccGfTsT	56	CCGAGGGccAUcGUGAGUAfTsT	44%	2%	97%	9%
ND8313	57	uuuGGAGAGuAcuAcAGcTsT	58	GCUGAAGuAcUCCSMAATsT	14%	2%	16%	2%
ND8314	59	GcAGAcCuuuuGAcuGfTsT	60	cAGUcAAAGAGccUUCGfTsT	55%	4%	58%	5%
ND8315	61	cuAcAuCuuuAcuccGfTsT	62	CCGCCGUAAGAGUAUGfTsT	20%	3%	26%	4%
ND8316	63	AGCCGAAuuAcuAcuAcuTsT	64	AAGUCAGAGuuAUUCGCUfTsT	24%	1%	25%	2%
ND8317	65	ccGcuuccAAccAGGuccfTsT	66	GGAGAcUcGGUUGAAGCGfTsT	62%	5%	64%	4%
ND8318	67	CAAccGcAuGAAAGcGGccfTsT	68	GGCCUCUuAcUcGGUUGfTsT	54%	6%	54%	4%
ND8319	69	AUGAGAcGGccuucGfTsT	70	CCcAGAGGGCCUUCUcAUfTsT	44%	4%	44%	6%
ND8320	71	AGcAcAAccGcAUGAGAcTsT	72	GUcUuAcUcGGUUGUUGUfTsT	15%	1%	16%	1%
ND8321	73	ucGAGuuccAccGcuccuATsT	74	uAGGAGCGGUGGAAcUcGATsT	85%	5%	89%	13%
ND8322	75	cuGcuuccuAcAGAcAuAcTsT	76	GuAUcUUGGUAGAGcAGfTsT	46%	4%	44%	3%
ND8323	77	GAGGGAGuGUAcCGcuccfTsT	78	GMAGCGuAcAcUcUCCUcTsT	60%	7%	56%	3%
ND8324	79	ccuuuAuGGAuGUGGUGfTsT	80	CcAcAUcAUcCAuAAAGfTsT	83%	9%	82%	1%
ND8325	81	uGAGGGAGuGGuAcCGcuccfTsT	82	AAGCGuAcAcUcUCCUcATsT	77%	6%	72%	2%
ND8326	83	CcUGcAAccAGCGAAuuATsT	84	uAAUUGCCUUGUUGcAGGfTsT	41%	4%	44%	7%
ND8327	85	GGccuGGcGUGGAGAcuccfTsT	86	GNGUcUcAcCGcAcGGCCfTsT	101%	5%	95%	4%
ND8328	87	uGcuuuuCGGAGAGuAcuTsT	88	AAGUAcUcUCCGAAAGcATsT	36%	1%	29%	2%
ND8329	89	cccGuAGcGUGccuccAGfTsT	90	CUGGAGGGcAcGcUAcGGfTsT	52%	1%	51%	2%
ND8330	91	ccGuAGcGUGccuccAGcTsT	92	GCUGAGGGcAcCGcUAcGGfTsT	86%	9%	84%	3%
ND8331	93	CCAGGGcGAAuuAcuAcuAcTsT	94	GUcGAGAGuAAUUGCCUUGfTsT	15%	2%	13%	1%

ND8332	95	GAACUGCUAAUCUUUCAATAT	96	UUGAAGUAUAAGCAGUUUCAT	10%	1%	10%	1%
ND8333	97	GCCCCGUAUUGGUUGCAGCTAT	98	CUUGCACCAUUAACCCGGCCAT	83%	4%	82%	4%
ND8334	99	CCCCGGUAUUGGUUGCAGCTAT	100	CCUGGACCAUUAACCCGGCTAT	56%	4%	71%	10%
ND8335	101	CCGGUAUUGGUUGCAGCTAT	102	GCCCCGUAUUAACCCGGCTAT	42%	3%	91%	8%
ND8336	103	GGGUUAUUGGUUGCAGCTAT	104	UCCCCGUGCACCAUUAACCCCTAT	65%	5%	71%	7%
ND8337	105	UAUUGGUUGCAGCTAT	106	UCCCCGUGGUUGCAGCAUUAATAT	46%	3%	46%	4%
ND8338	107	CUUGGUUAUCAGGAGGCTAT	108	GGCCAUUGGUUGAUAACAGATAT	74%	5%	79%	10%
ND8339	109	GUUAUCAGGAGGCTAT	110	GAGGGCCAUUGGUUGAUAACCTAT	85%	6%	92%	8%
ND8340	111	UGUUCAGGAGGCTAT	112	GAGGGGACCAUUGGUUGAUAATAT	85%	4%	74%	5%
ND8341	113	UGUUCAGGAGGCTAT	114	CUUGGAGCCAUUGGUUGAUAATAT	37%	2%	32%	3%
ND8342	115	UCCGAGGAGGCTAT	116	CGCCUUGGAGGCTAT	60%	4%	47%	5%
ND8343	117	UCCGAGGAGGCTAT	118	ACCAUAUUGGUUGAUAATAT	15%	1%	13%	2%
ND8344	119	AGCCGAUUGGUUGGCTAT	120	CUUGGAGCCAGUAUUGGUUGCTAT	49%	3%	41%	3%
ND8345	121	CUUGGAGGCTAT	122	GUUCAGGAGGCTAT	55%	2%	47%	4%
ND8346	123	CUCCGUAUGGAGGCTAT	124	TUUAUUGGUUGGCTAT	67%	3%	57%	5%
ND8347	125	UCCGUAUGGAGGCTAT	126	GUUAUUGGUUGGCTAT	29%	1%	26%	3%
ND8348	127	UGCAUUAUUGGUUGGCTAT	128	UACAAAGAAUUGGUUGGCTAT	17%	1%	15%	3%
ND8349	129	UUUCCGUAUUGGUUGGCTAT	130	AGCAUACAAUUGGUUGGCTAT	68%	2%	50%	4%
ND8350	131	UCCCGUAUUGGUUGGCTAT	132	GAGCAUACAAUUGGUUGGCTAT	59%	8%	44%	6%
ND8351	133	GGACCCUAGGAGGCTAT	134	CUUGCAGGAGGCTAT	86%	11%	82%	2%
ND8352	135	CCUAGGAGGCTAT	136	UUGGCUUGCAGGAGGCTAT	69%	7%	79%	3%
ND8353	137	UUGGCUUGGAGGCTAT	138	UUGCCAGUACAUUGGUUGGCTAT	58%	4%	52%	4%
ND8354	139	UAUUGGCAUUGGUUGGCTAT	140	GAGGGGAAUUGGUUGGCTAT	101%	4%	100%	4%
ND8355	141	AAUUGGCUUGGUUGGCTAT	142	CCGAAAGGAGGCTAT	49%	1%	43%	6%
ND8356	143	CUUUAUUGGAGGCTAT	144	AGUAUUGGAGGCTAT	17%	3%	18%	1%
ND8357	145	UUUGGAGGAGGCTAT	146	AGCUAGGAGGCTAT	13%	3%	16%	2%

ND8358	147	AgcAGAcGcucuuuGAcCuTst	148	AGGUcAAAGAGcGUcUGcUTst	73%	9%	71%	5%
ND8359	149	cuuGcAGcGccuGAGGcUcTst	150	GACCCUcAGGcGcUGcAAgTst	57%	9%	64%	7%
ND8360	151	UGcUUuAAcuuGcGcCuTst	152	AGCCcGcAAGUuAAAGCcATst	102%	12%	106%	10%
ND8361	153	GcUUuAAcuuGcGcCuGgTst	154	CcAGCCcGcAAGUuAAAGCcTst	83%	5%	82%	8%
ND8362	155	uAAcuuGcGcCuGcCuGgTst	156	cAGCCcAGGcGcAAGUuATst	119%	2%	115%	6%
ND8363	157	AccuuAuccuuAAAGuATst	158	uACUUUGAAgGUuAAAGGUtst	17%	3%	13%	2%
ND8364	159	GGuuAcuAcGAGUGcCcuTst	160	AGGcCAUCUGUGuAAcCTst	104%	9%	117%	17%
ND8365	161	cAGAUgGccuGcGAGAcTst	162	GUcACcGAGGcCAUCUGGtst	140%	13%	100%	9%
ND8366	163	AGAUgcuAuGcGcAGAcTst	164	UUcUGUCGcGAUGcAUcUTst	46%	2%	70%	6%
ND8367	165	AcGauGgucAcccuccuGtst	166	AcAGGAGGUGAcAUCGUTst	85%	6%	128%	10%
ND8368	167	cuccGAAgGUuccGAAgGcTst	168	GcCUUCGGAACCUUGGAGTst	12%	2%	18%	1%
ND8369	169	AGGUuccGAGccGUAcTst	170	GUuICGcUUGGAAccUUTst	63%	7%	114%	19%
ND8370	171	GGuAcuGccuGAAcAcuTst	172	AGUUGcAGAGGcAGUAcCTst	36%	3%	71%	6%
ND8371	173	AGcUUgAcAAAGGAcuuTst	174	AAAGUUCUUGUcAAAGCUtst	17%	1%	21%	1%
ND8372	175	uuUGAcAAGGAcuuuccuTst	176	AGGAAGUUccUUGcAAATst	16%	2%	26%	4%
ND8373	177	UGAcMAGGAcuuuccuATst	178	UUAGGAAGUUCUUGUcATst	12%	1%	22%	5%
ND8374	179	cccGUAGcAcAuAAcATst	180	UGUUuAAGUGUGuAcGGGtst	41%	2%	75%	3%
ND8375	181	cAcuAuAcAuCuGcUGGATst	182	UCcAGcAGUcGUuAAAGUGtst	17%	1%	26%	2%
ND8376	183	uuGcuGuuGcAccAuAcuuTst	184	AAAGUUGUGcAAcAGcAATst	45%	4%	69%	6%
ND8377	185	GUAcUGcAAuuccGcCuGtst	186	cAGGcGAAUUGcAGUAcTst	60%	6%	120%	8%
ND8378	187	uuCGccuGcUUuuccGAGcTst	188	CUCCGAAAGcAGCCCGAATst	57%	5%	86%	11%
ND8379	189	ccuGcuuuCGGAGAGuAcTst	190	GUAcUcUCCGAAAGcAGGtst	43%	5%	50%	3%
ND8380	191	GcUUuucGGAGAGuAcuucTst	192	GAAGUAcUcUCCGAAAGCcTst	16%	2%	24%	2%
ND8381	193	cuuuucGGAGAGuAcuucATst	194	UGAAAGUAcUcUCCGAAAGGtst	12%	1%	16%	3%
ND8382	195	cAAcncAAcuCGGAcAAgTst	196	CUUGUCCGAGUUGAGGUUGtst	33%	2%	39%	3%
ND8383	197	cuAAcAGAcAuAcuAcuAcTst	198	UGAUAGUuUGUcUGGUAATst	13%	1%	23%	6%

ND8384	199	cuGucGAGccuGccAGAGATsT	200	UCUCUggcAGCCUCCcAGsTsT	11%	1%	18%	3%
ND8385	201	AAAcuGcUAuAcuuucAAuTsT	202	AUDGAAAGGuAAAGcAGUUUsT	48%	8%	64%	11%
ND8386	203	GGcuuuAcuuGcGGccuGsTsT	204	cAGGccGcMGTUAAAGCCTsT	55%	7%	70%	8%
ND8387	205	cuuuAAcuuGcGgc-cuGgcTsT	206	GCcAAGCCcGcMAGUAAAGTsT	40%	11%	87%	14%
ND8388	207	AGGuGUAuuAcuuccuGsTsT	208	cAGGAGTGAUAcAcACCUsTsT	45%	3%	41%	5%
ND8389	209	AcGAUGcc-cucGGuGAcATsT	210	UGUcAOCcAGGcGcAUcGUUsT	43%	2%	60%	9%
ND8390	211	cUGAAcAcucucGuuuuccTsT	212	GGAAAGcAGAGUcUcAGTsT	33%	2%	48%	11%
ND8391	213	cuAAuAAcuGcUcGGAATsT	214	AcUCCAGcAGAUcGUUAAGTsT	16%	1%	17%	4%
ND8392	215	GcAccAAuAcuuucuuGUAcTsT	216	GUAcAAGAAAGUAUGGUcTsT	19%	1%	22%	4%
ND8393	217	UGcUAAGccCAUcAUccUGTsT	218	cAGGAUGAUgGcGUAGAcATsT	69%	3%	92%	15%
ND8394	219	AGGAccuAAAGccuGcATsT	220	UGcAGAGGUTcUAGGGUCCUsT	94%	5%	86%	13%
ND8395	221	ccAccGcuccuAccGAGAGTsT	222	cUCUcGGUAAGGAGGGUGGTsT	55%	1%	65%	6%
ND8396	223	uAccGAGAGcucuuGcAGUsTsT	224	AcUcGAAAGcUcUcGGUAUsTsT	11%	1%	11%	1%
ND8397	225	AACAUcUUGUGAGGcUcGcTsT	226	GcAGCCUcGAcAGGAGUUGUsTsT	90%	7%	72%	11%
ND8398	227	GAccuuuAAccuuuAAAGTsT	228	CUUUGAAAGGUAAGGUUcTsT	22%	2%	25%	4%
ND8399	229	GGuuccGAAAGccGUAUcUGTsT	230	cAGUAUcGccUcUcGAAAcTsT	93%	9%	89%	9%
ND8400	231	AAGccGUAUcUGGcUcUcATsT	232	UGGAGACcGUAUcGGcUUsTsT	35%	2%	42%	9%
ND8401	233	ucuAGccCAUcAUccuGUsTsT	234	AGcAGGAUGUgGcUAGATsT	95%	8%	95%	14%
ND8402	235	cGgcGccAUccGccuGGUGTsT	236	cACCAGGcGGAUGGGCCCGTsT	81%	8%	89%	17%
ND8403	237	uuucGGAGGUAcuuAcATsT	238	cUGAAAGUAcUcUcGAAATsT	13%	1%	13%	1%
ND8404	239	GAGAGUAcuuAcGcUAccTsT	240	GGGUAAGUAGUAUcUcTsT	71%	3%	100%	10%
ND8405	241	GAcGcUuuuGAcCUUAcTsT	242	GUAcAGUcAAAGAGcUcTsT	84%	5%	92%	13%
ND8406	243	UGUUAUcAcuuccuGcuUsTsT	244	AAcAGGAGUGAAUAcATsT	78%	2%	89%	8%
ND8407	245	AAcAAcAGAGAAuGGAGTsT	246	cUCCAUUcUcUcUUGUUGUsTsT	66%	3%	88%	21%
ND8408	247	AuuGAGGUAUGcAGGGcTsT	248	GCCcUUGcAcAUcUcUcAAUsTsT	25%	1%	36%	6%
ND8409	249	ucucAGAGcGccAAAcUUsTsT	250	AGUUUGGcGcUcUGAGATsT	18%	1%	24%	2%

ND8410	251	AAACAGACcAAAGGGUACATsT	252	UGUACCCUUGGUUGUUGUUTsT	21%	1%	35%	2%
ND8411	253	UAcceGUccocucAcAGNGTsT	254	CUUUGUGAGGcAcGGGUATsT	57%	2%	67%	4%
ND8412	255	UAGcAcAcuAuAAcAuCuGTsT	256	CAGAUUUAUUGUGUGCUATsT	30%	2%	41%	1%
ND8413	257	GGuGuAuucAcuocucGtsT	258	GcAGGAGUGAAUAcAcAcCTsT	73%	1%	90%	9%
ND8414	259	cAugAuCANGAGUGUGGcTsT	260	GCcAcAcUCCUUGAUcAUUGTsT	65%	2%	67%	5%
ND8415	261	AcucAcGauGccocucGGuTsT	262	AcCGAGGcCAUCCUGAGUTsT	96%	6%	95%	6%
ND8416	263	GGAGcuuUGAcAAGGAACuTsT	264	AGUUCUUGUcAAAGCUCCTsT	24%	1%	28%	4%
ND8417	265	AuAcccGUgocccucAcAGATsT	266	UCUGUGAGGcAcGGGUAUTsT	54%	1%	62%	2%
ND8418	267	GGAGUGccAAAGUcAcATsT	268	UGUUGACUUUGGcAcCUCCTsT	93%	2%	86%	11%
ND8419	269	AACuAcAAAccAAUucUGTsT	270	CAGAUUUGTUUUGUAGUUTsT	101%	5%	108%	19%
ND8420	271	UGcUGGAGUGUGcUGuUGTsT	272	CAACAGcAAcAcUcCAGcATsT	29%	1%	26%	1%
ND8421	273	AGGUCUCCUGcAAcCAGGcTsT	274	GCCUGGUUGcAGGAGACCUTsT	95%	10%	91%	17%
ND8422	275	CUUUGcAuGUGUAcUGGTsT	276	CcAGuAcAUcAUcCCAAAGTsT	86%	3%	84%	6%
ND8423	277	cAucGcAcocucAAUccTsT	278	GGGUAUGGGGUGcAGAUcTsT	82%	11%	73%	4%
ND8424	279	CGAcUGcAcAAAGAUcGGcTsT	280	GcAUUcUUUGUGcAGUcTsT	70%	8%	69%	7%
ND8425	281	AAAcAcAAccAAAGGUAcTsT	282	GUACCCUUGGUUGUUGUUTsT	95%	6%	106%	12%
ND8426	283	cAucUGcUGGAGUGUUGcUtsT	284	AGcMAcAUcAcAGcAGUcTsT	30%	2%	37%	1%
ND8427	285	ccuAcAucucUuUccGcTsT	286	CcGGAUAGAAAGAUcAGcTsT	42%	6%	30%	1%
ND8428	287	GccuAcAucucUuUccGcTsT	288	GcGGAUAGAAAGUcUAGcTsT	65%	7%	54%	3%
ND8429	289	GAGUGAcocGcuUccAcuTsT	290	AGUGAAcGcGUcAcCUcTsT	95%	11%	86%	19%
ND8430	291	GGUAcCcuUccAcuAcAUtsT	292	AUGUAGUGGAGGcGUAcCTsT	111%	19%	96%	14%
ND8431	293	GuGGuAccGcuUccAcuAcTsT	294	GUAGUGcMCCGGuAcCCTsT	98%	13%	52%	26%
ND8432	295	GMuuAcucUcAcuUccAcTsT	296	GUGGAUGUGAGAAUUCCTsT	111%	21%	73%	27%
ND8433	297	AuuAcucUcAcuUccAcCTsT	298	GUGGAAUGUGAGAAUUCCTsT	109%	22%	105%	7%
ND8434	299	uAcucUcAcuUccAcCCTsT	300	GGUGGAGUGAGAGUATsT	106%	23%	95%	7%
ND8435	301	AGuGGuAccGcuUccAcuATsT	302	uAGUGAAcGcGUcAcCUtsT	109%	18%	102%	9%

ND-8436	303	GGcAaUucAucUucGcctT	304	GGGAAAGUAGUAGUUGCCCTT	18%	107%	14%
ND-8501	305	AGCCCGIAGCGUUGCCUCCCTT	306	GGAGCCAGCGUUGCGGCTT	84%	69%	3%
ND-8502	307	CGGGUAUUGGUUCACGGCTT	308	CCCGUACACAUUACCCGGT	41%	30%	2%
ND-8503	309	AUGCUAUCGACAGAACAT	310	UGUUCUGUCGCAUAGCAU	11%	10%	2%
ND-8504	311	UGCUAUCGACAGAACAT	312	UUGUUCUGUCGCAUAGCAU	15%	10%	0%
ND-8505	313	GCCGUAUUGUUGUUCCTT	314	GGAGCAUACAUAAAGCGCT	23%	16%	1%
ND-8506	315	GCCGUAUGCGUCCCAT	316	UGAGCCAGCGUAGCGCT	32%	22%	1%
ND-8507	317	CCGAAAUUAAAGAGGAGCT	318	GCUCUCUUAUUUCGCT	35%	24%	1%
ND-8508	319	CCGAGGUUCCGAAAGCGAT	320	UCGCUUCGAAACCUUCGCT	19%	13%	1%
ND-8509	321	GCAUUCGCGUUCUUCCT	322	GAAGAAGCGCCGAAUUGCT	12%	8%	1%
ND-8510	323	GCGAAUUAUCUUCUUCCT	324	GAGUGAGAGUAAUUCGCT	21%	18%	1%
ND-8511	325	GCGAAUUAUCUUCUUCCT	326	GGAUGAGAGUAAUUCGCT	12%	8%	1%
ND-8512	327	AACGAGCGAAUUAUCUUCCT	328	GAGAGUAAUUCGCGUUT	99%	79%	5%
ND-8513	329	GGUUAUGUGUCCAGCGCT	330	CUGCCUGUCCACCAUUCCT	61%	42%	4%
ND-8514	331	CUACGUAUGGCUUCAGGCT	332	CAOCGAGGCGUUCGUGCT	94%	70%	4%
ND-8515	333	GCUCGAGGCUUCGAGCT	334	GCUCGAAUUCGAGGCT	18%	17%	2%
ND-8516	335	GCCGUAUCUGUUCUCCAGGCT	336	CCUGGAGACGUAUCGCGCT	14%	12%	1%
ND-8517	337	CCGUAUCUGUUCUCCAGGCT	338	GCUGGAGACGUAUCGCGCT	42%	33%	2%
ND-8518	339	UGCUUUGCACCAUUCUUCCT	340	AAAGUUGGUGCAACAGCAT	10%	9%	0%
ND-8519	341	AACGGUUGUCCUUGUUCCT	342	GCAUCAGGACAGACGGUUT	60%	52%	8%
ND-8520	343	UUAACUUGCGGCUUGGUGCT	344	ACGCGAGGCGCAAGUUAAT	82%	77%	18%
ND-8521	345	GCUGUUAUCACGAGGCT	346	GCCAUUGGAGUAAOCAGCT	36%	34%	7%
ND-8522	347	UUAUCAGAUUGGCUUCGCT	348	CGAGGCGUUCGUGUAAT	105%	113%	21%
ND-8523	349	GAAGCGUAUCUUCUUCCT	350	GGAGACGUAUCGCGUUCCT	24%	18%	2%
ND-8524	351	GAUACUGUUCUCCAGGCGAT	352	CGGCUUGGAGACCGUUCCT	30%	25%	3%
ND-8525	353	AUACUGUUCUCCAGGCGAT	354	UCGCGUUGGAGACCGUUCCT	12%	11%	2%

ND-8526	355	CAAGGGUUCUCCUUGAUGTST	356	CAUCAGGGACAGACCUGTST	24%	7%	24%	24%	2%
ND-8527	357	UUUAACUUGGGCCUUGGGTST	358	CGCCAGGGCCGAAGUUAATST	122%	6%	107%	107%	9%
ND-8528	359	UACUCACGALUGCCUUCGGTST	360	CCGAGGGCCAUCCUGAGUATST	78%	6%	84%	84%	7%
ND-8529	361	UUUCGGAGAGUACUUCAGCTST	362	GCUGAAGUATCTCCGAAATST	87%	18%	80%	80%	17%
ND-8530	363	GCAGACGCUUUTGACCUGTST	364	CAGSUCAAAGAGCGUUCGCTST	14%	2%	13%	13%	0%
ND-8531	365	CUACAUCUUCUUCGCCGGTST	366	CCGGGUAAGNAGUUGAGTST	20%	4%	18%	18%	3%
ND-8532	367	AGCGAAUUAUCUCACUUTST	368	AAGUGAGAGUUAUUCGCCUUTST	25%	5%	18%	18%	1%
ND-8533	369	CCGUUCAACCCAGGUCUCCST	370	GGAGACCUUGGUUGAAGCGGTST	30%	11%	22%	22%	2%
ND-8534	371	CAACCGCAUIGAAGCGGCTST	372	GGCCGUCUUCUUGGGUUGTST	33%	4%	23%	23%	1%
ND-8535	373	AUGNAGCGCCUUCUGGGTST	374	CCGAGAGCGCCUUCUATST	114%	12%	84%	84%	15%
ND-8536	375	AGCACACCACUIGMAGACTST	376	GUCUUCUUGGGUUGUCUUTST	18%	1%	16%	16%	3%
ND-8537	377	UCGAGUUCACCCUCCUATST	378	UAGGAGCGGUGGAACUCGATST	25%	0%	26%	26%	3%
ND-8538	379	CUCCUUCUUAQCAGACUACTST	380	GUUUGUCUUGGUJAGAGCAGTST	12%	1%	13%	13%	2%
ND-8539	381	GAGGGAGUGGUJACCUCUUCTST	382	GAACGGUUAOCACUCCUCUUTST	43%	1%	47%	47%	14%
ND-8540	383	CCUUUAUGGUAUGUUGGGTST	384	CCACCUCUACUCCAUAAAGGTST	61%	5%	60%	60%	8%
ND-8541	385	UGAGGGAGUGGUACCGCUUTST	386	AAGCGUACCCACUCCUUCATST	36%	5%	35%	35%	5%
ND-8542	387	CCUGCAACCAGCGAAUUAUTST	388	UAUUUGCCUUGGUUGCAGGTST	19%	2%	16%	16%	1%
ND-8543	389	GGCCUGGGUGGAGACCUCUUTST	390	GAGGUUCUCCAGCCAGGCCUUTST	28%	7%	20%	20%	2%
ND-8544	391	UGCUUUUGGAGAGUACUUTST	392	AAGUACUUCGCCAAAGCATST	22%	5%	17%	17%	1%
ND-8545	393	CCGUAAGCGUGGCCUCCAGTST	394	CUGGAGGCCACGUACGGGTST	25%	3%	22%	22%	2%
ND-8546	395	CCGUAGCCUGGCCUCCAGCTST	396	GCUGGAGGCCACCCUACGGTST	62%	5%	57%	57%	9%
ND-8547	397	CCAGGGAAUUAUCUCUCCACTST	398	GUAGAGUUAUUUGCCUUGGTST	23%	11%	16%	16%	2%
ND-8548	399	GAACUCCUUAUCUUCUUAATST	400	UUGAAAGUUAJAGCAUUCUUTST	9%	3%	3%	3%	0%
ND-8549	401	GCCCGGUUAUUGGUCCACGCTST	402	CGUGCACCAUUAUCCCGGGCTST	87%	9%	92%	92%	14%
ND-8550	403	CCCGGUUAUUGGUCCACGCTST	404	CCGUGCACCAUUAUCCCGGGTST	19%	12%	14%	14%	1%
ND-8551	405	CGGGUUAUUGGUCCACGCTST	406	GCCCGUCCACCAUUAUCCCGTST	68%	11%	73%	73%	3%

ND-8552	407	GGUUAUUGGUCACGGCCATsT	408	UGCCCGUGCACCACAUUACCCTsT	30s	6s	33s	2s
ND-8553	409	UAUUGGUGCACGGCCAGGATsT	410	UCCUGCCGUGCACCACAUUATsT	29s	3s	31s	1s
ND-8554	411	CUUGUUAUCUACGAUGGCGTsT	412	GGCCAUUGUGAGUAGACCAGTsT	74s	15s	66s	8s
ND-8555	413	GUUACUACGAUGGCGUUCTsT	414	GAGGGCCAUUGUGAGUACATsT	91s	21s	88s	10s
ND-8556	415	UGUCACGAUGGUCACCCUCTsT	416	GAGGUGACCAUUGUGACATsT	72s	4s	76s	12s
ND-8557	417	UGUCOCGAAGGUUCOGAATsT	418	CUUCGGAACCUUGGAGCATsT	51s	2s	59s	18s
ND-8558	419	UCCGAAGGUUCCGAGCCGsT	420	CGCUUCGGAAACCUUCGGATsT	109s	11s	77s	13s
ND-8559	421	UUCGGAAGCAGAUUCUGGUsT	422	ACCAGUAUCGCGUUCGGAAFsT	46s	20s	33s	6s
ND-8560	423	AGCGAUACUGGUCUCCAGTsT	424	CUGGAGACCAUUGCGCUUsT	15s	6s	10s	1s
ND-8561	425	CUUGGUACUGCCUCUGAATsT	426	GUUCAGAGGCCAUUCCAAATsT	16s	3s	12s	3s
ND-8562	427	CUCCCGUAGCACAUUAATsT	428	UUUAUAGUGUCCUACGGGATsT	14s	6s	10s	1s
ND-8563	429	UCCGUAGCACAUUAATsT	430	GUUAUAGUGUCCUACGGGATsT	43s	11s	36s	4s
ND-8564	431	UGCACCAUACUUCUUGUATsT	432	UACAGAAAGUAUGGUGCATsT	17s	6s	13s	3s
ND-8565	433	UUGCCGUUAUGUUGCUUsT	434	AGCAUACAUAAACGGCCATsT	84s	2s	103s	12s
ND-8566	435	UGCCCGUUUAUGUUGCUUsT	436	GAGCAUACAUAAACGGCCATsT	69s	25s	93s	4s
ND-8567	437	GGACCCUAGACCUCUGCAGTsT	438	CUGCAGAGGUUCUAGGGUUCTsT	29s	8s	33s	2s
ND-8568	439	CTUAGACCUUGCAGCCCATsT	440	UGGGUUGCAGAGGUUCUAGTsT	18s	2s	19s	1s
ND-8569	441	UGGCAUGAUUAGUUGGCAATsT	442	UUCCAGUACAUUUGCCATsT	19s	3s	20s	5s
ND-8570	443	UACUUGGCAUUCGGUUGCTsT	444	GCAGGCCGAUUGCCAGUATsT	86s	15s	83s	16s
ND-8571	445	AUUCGGCCUGCUUUCGTsT	446	CCGAAAAGCAGGCCAAUUsT	19s	3s	24s	4s
ND-8572	447	CUCCUUUCGGAGAGUACUsT	448	AGUACUUCUGAAAAGCAGTsT	8s	2s	12s	2s
ND-8573	449	UUCGGAGAGUACUUCAGCUUsT	450	AGCUGAAAGUACUUCGGAATsT	27s	3s	40s	5s
ND-8574	451	AGCAGACCUUCUUGACUUsT	452	AGGUAAGAGAGGUCUUGCUUsT	15s	0s	19s	4s
ND-8575	453	CUUCAGGCGCUGAGGGUUsT	454	GACCCUACGGCGUUGCAAGTsT	35s	1s	40s	4s
ND-8576	455	UGCUUUAAACUUGCGCCUUsT	456	AGCCCGCAAGUUAAAGCCATsT	47s	3s	53s	8s
ND-8577	457	GCUUUAACUUGCGGCUUGTsT	458	CCAGGGCCAAAGUUAAAGCTsT	20s	2s	25s	5s

ND-8578	459	UAACTUUGGGCCUGGGCGUGTGT	460	CAGCCAGGCCGCAAGUUAATST	75%	7%	82%	4%
ND-8579	461	ACCUUAACCCUUCMAAGUATST	462	UACUUAAGAGGCUAAAGGUTST	14%	2%	17%	3%
ND-8580	463	GGUUAUCACAGUUGGCCUUTST	464	AGGCCAUCGUGAGUAACTST	63%	5%	70%	11%
ND-8581	465	CAQSAUGGCCUUCUGGUGACTST	466	GUCACCGAGGCCCAUCUGTST	56%	2%	50%	5%
ND-8582	467	AGAUGCUAUCGCGACAGAAATST	468	UUUCUGCGGUAAGCAUCUTST	18%	1%	18%	1%
ND-8583	469	ACGAUGUACCCUCCUGUTST	470	ACAGAGGUGUACCAUCGUTST	48%	3%	52%	6%
ND-8584	471	CUCCGAGGUUCGAGGCCUUTST	472	GGUUCGAGACCUUCGAGGUTST	18%	2%	20%	5%
ND-8585	473	AAGUUCGAGAGCGAUACTST	474	GUUUCGGUUCGGAACCUUTST	26%	2%	28%	1%
ND-8586	475	GGUACUGCCUUCGAAACACUTST	476	AGUUCACAGGGCAGUACCTST	12%	1%	12%	1%
ND-8587	477	AGUUUGACAAAGGAACUUUTST	478	AAAGUUCUUCGUAAGGCUUTST	17%	2%	18%	2%
ND-8588	479	UUUGACAAGGACUUUCUUTST	480	AGGAAGUUCUUCGUAAGGCUUTST	78%	5%	73%	2%
ND-8589	481	UGACAAAGGACUUUCUUAATST	482	UUAGGAAGUUCUUCGUAAGGCUUTST	14%	1%	16%	1%
ND-8590	483	CCGUAAGCACACUUAACATST	484	UGUUAAGUGUGCUACGGGUTST	9%	1%	11%	2%
ND-8591	485	CACUUAACAUUCUGUGCATST	486	UCCAGCAGAUUUAUAGUGTST	18%	2%	20%	2%
ND-8592	487	UUUCUGUUGCACCAUACUUTST	488	AAAGUUGGUGCAACAGCAATST	23%	2%	25%	8%
ND-8593	489	GUACTUGGCAUUCGGCCUGTST	490	CAGGCCAAUUGCCAGUACTST	66%	3%	62%	4%
ND-8594	491	UUUGGCUUGCUUUUGGAGTST	492	CUCCGAAAAGCAGGCCGAAATST	97%	7%	86%	8%
ND-8595	493	CCUGCUUUUGGAGAGUACTST	494	GUACUUCGGAAGCAGGUTST	11%	2%	14%	3%
ND-8596	495	GCUUUCGGAGAGUACUUCATST	496	GAAGUACUUCGCAAAAGCTST	12%	1%	17%	2%
ND-8597	497	CUUUUGGAGAGUACUUCATST	498	UGAAGUACUUCGCAAAAGCTST	11%	1%	14%	2%
ND-8598	499	CAACCUCAACUCCGACAAAGTST	500	CUUGUCCGAGUUGAGGUUGTST	15%	2%	16%	2%
ND-8599	501	CUACCAGACAUUACUUAUACTST	502	UGAUGAGUUAUGUUGGUAGTST	17%	1%	18%	2%
ND-8600	503	CUUGUGGCGUCCGACAGATST	504	UCUCUGGACGCCUCCGACAGTST	17%	0%	16%	1%
ND-8601	505	AAACUGCUUAUACUUUCAUUTST	506	AUUGAAAAGUUAJAGCAGUUUTST	28%	1%	26%	1%
ND-8602	507	GGCUUUAACUUGGGCCUGTST	508	CAGGCCGCAAGUUAAGGCUUTST	21%	2%	18%	1%
ND-8603	509	CUUUUAACUUGGGCCUGGCTST	510	GCCAGGCCGCAAGUUAAGGCTST	81%	2%	69%	6%

ND-8604	511	AGGUGUAUUACUCCUGTBT	512	CAGGAGUAUAACACACCUBT	47%	4%	40%	1%
ND-8605	513	ACGAIAGCCUUCGGGACATBT	514	UGUCACCGAGGGCCAUUGTBT	40%	6%	35%	2%
ND-8606	515	CUGAACACTUGGUUCCCTBT	516	GGGAAACCACAGUUCACBT	60%	2%	75%	4%
ND-8607	517	CUAUAACNUCGUGGAGTBT	518	ACUCCACAGAGUAUAAGTBT	17%	1%	24%	3%
ND-8608	519	GCACCACUUCUUGUACTBT	520	GUACAAGAAAGUIGUGTBT	10%	1%	15%	3%
ND-8609	521	UGUUAAGCCAUUCCUUGTBT	522	CAGGAUGAUGGGUAGACATBT	62%	2%	75%	12%
ND-8610	523	AGCACCUUAGACCUUGCATBT	524	UCACAGGUCUAGGGUCCUBT	61%	5%	73%	10%
ND-8611	525	CCACCGUCCUACCGAGTBT	526	CUUCGUAAGGACCGUGGCTBT	21%	2%	29%	5%
ND-8612	527	UACCGAGAGUCUUCGAGTBT	528	ACUCGAAGAGUCUUGGUAFT	13%	1%	22%	3%
ND-8613	529	AACAUCUUGCGAGGUGTBT	530	GCAGCCUUGACAGGAUUGTBT	57%	2%	70%	4%
ND-8614	531	GAACUUUACCUUCAAAGTBT	532	CUUUGAAGGGUAAGGUUCTBT	13%	3%	16%	2%
ND-8615	533	GGUUCGAAAGCCGUAUCGCTBT	534	CAGUAUCGGUUCGGAACTBT	18%	1%	24%	2%
ND-8616	535	AAGCCGAUUCUGGUCUCCATBT	536	UGGAGACCAGUAUCGGCUFT	19%	1%	25%	2%
ND-8617	537	UCUAGCCAUUCAUCCUGCTBT	538	AGCAGGAUGAUGGGUAGATBT	93%	3%	101%	3%
ND-8618	539	CGCGGCCAUUCGCGUGGUGTBT	540	CACCCAGGGGAUUGGGCCGCTBT	85%	4%	99%	4%
ND-8619	541	UUUUCGGAGUAUUCAGTBT	542	CUGAAGUACUUCGGAATBT	63%	2%	77%	3%
ND-8620	543	GAGAUACUUCAGUACCCCTBT	544	GGGUAUCUGAAGUACUUCTBT	26%	1%	30%	4%
ND-8621	545	GAGCUUUUGAUCUUGACTBT	546	GUACAGGUAAGAGUGCTBT	17%	2%	19%	3%
ND-8622	547	UGUGUAUUCACUUCUGUFTBT	548	AAGCAGGAGUAUAACACATBT	49%	3%	58%	11%
ND-8623	549	AACAACAGAGAAUUGGACTBT	550	CUCCAUUCUUCUUGUUGTBT	74%	7%	70%	4%
ND-8624	551	AUUGAAGAUUGUGCAGGCTBT	552	GGCUUCACAUUCUCAAUTBT	85%	6%	87%	12%
ND-8625	553	UCUCAGAGCCGCCAAACUFT	554	AGUUUGGGCCUCUGAGATBT	53%	3%	51%	6%
ND-8626	555	AACACAAACAAAGGUAACATBT	556	UGUACCUUUGGUUGUUGTBT	17%	2%	18%	2%
ND-8627	557	UACCCGUGCCUUCACAGATBT	558	CUUCUGAGGGCACCGGUAFT	58%	3%	55%	3%
ND-8628	559	UAGCACAUUAACAUCUFT	560	CAGAUUAUAGUUGUATBT	64%	3%	64%	15%
ND-8629	561	GGUGUGUAUUCACUCCUGCTBT	562	GCAGGAGUAUAACACACCTBT	25%	3%	23%	2%

ND-8630	563	CAUGAUCAGGAGUGUGGCTsT	564	GCCACACUCCUUGAUCAGTsT	32%	2%	28%	2%
ND-8631	565	ACUCAGAGCGCCUCGGTsT	566	ACCGAGGCCAUCGUCAGTsT	96%	1%	88%	4%
ND-8632	567	GGAGCUUGACAAGGAACUtsT	568	AGUUCUUGUCAAAAGUCCtsT	14%	1%	14%	2%
ND-8633	569	AUACCGUGCCUCACAGATsT	570	UCUGAGAGGCCACGGUATsT	21%	2%	16%	1%
ND-8634	571	GGAGUGCCAAAGUCACATsT	572	UGUUGACUUUGCCACUCCtsT	21%	3%	16%	1%
ND-8635	573	ANCUACAAACCAUUCUtsT	574	CAGAAUUGUUUUGUAGUtsT	49%	5%	37%	3%
ND-8636	575	UGUGGAGUGUGCUGUtsT	576	CACAGCAACACUCCAGCATsT	27%	3%	21%	2%
ND-8637	577	AGGUCCUCGCAACAGGCTsT	578	GCUGGUGCAGGAGACCUtsT	62%	8%	61%	4%
ND-8638	579	CUUUGCAUUGAUGUUGGtsT	580	CCAGUACAUCAUGCCAAAGtsT	66%	6%	52%	8%
ND-8639	581	CAUCUGCACCCUCAUCCtsT	582	GGAUUGAGGGUGCAGAGTtsT	50%	7%	40%	4%
ND-8640	583	CGACTGCACCAAGAUUGGCTsT	584	GCCAUUCUUGGUGCAGUCGtsT	67%	6%	54%	5%
ND-8641	585	ANAACACAACCAAGGGUACTsT	586	GUACCCUUGGUUGUtsT	14%	2%	14%	1%
ND-8642	587	CAUCUGGAGUGUGUCUtsT	588	AGCAACACUCCACAGAGTtsT	13%	2%	13%	1%
ND-8643	589	CCUACAUUCUUAUCCGGtsT	590	CGGGAUAGAGAGUAGGtsT	15%	4%	13%	0%
ND-8644	591	GCCUACAUUCUUAUCCGGtsT	592	GGGAUAGAGAGUAGGtsT	14%	3%	11%	1%
ND-8645	593	GAGUGUACCGCUUCCACUtsT	594	AGUGGAAGCGUACCAUCtsT	16%	0%	20%	1%
ND-8646	595	GGUACCGUUCACUACAUtsT	596	AUGUAGUGGAAGCGUACtsT	12%	0%	14%	1%
ND-8647	597	GUUGUACCGUUCACUACTsT	598	GUAGUGGAAGCGUACCACTsT	42%	4%	44%	3%
ND-8648	599	GAAUUAUCUACUCCACTsT	600	GUAGAUGAGAGUAAUUCtsT	10%	1%	11%	3%
ND-8649	601	AAUUAUCUUCACUCCACTsT	602	GGUGGAAGUGAGUAAUtsT	105%	10%	102%	8%
ND-8650	603	UACUUCACUUCACCACTsT	604	GGUGGGAAGUGAGUAAtsT	55%	6%	54%	8%
ND-8651	605	AGUGUAACCGUUCACUtsT	606	UAGUGGAAGCGUACCACTsT	57%	6%	59%	12%
ND-8652	607	GGCAACUUCUUCUCCGGtsT	608	GGCAAGAGUAAUGUCCtsT	47%	12%	36%	7%

5 Tabla 1B. siARN seleccionados en un grupo de detección extendido (siARN solo humanos). Se identifican 344 secuencias de iARN adicionales y se diseñan secuencias de iARN para que sean completamente complementarias a las secuencias alfa-ENaC humanas, de acuerdo con los criterios de diseño descritos en la sección de ejemplos. Todos los siARN enumerados en este grupo de detección solo se modifican con un enlace 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 de dosis única (refiérase a la sección de ejemplos para los métodos utilizados)

ID de Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Anti-sentido	1ra detección de dosis única @ 50 nM en H441; RV	RD
ND-10445	609	CUCCGGCUAAGUCUCUUUUUtsT	610	AAAAGAGACUUAAGCCGCAgTsT	94%	8%
ND-10446	611	AUCCGACAGAACAAUUACTsT	612	GUAAUUUUGUUCUGCCGGAUtsT	13%	2%
ND-10447	613	UCGCGACAGAACAAUUACATsT	614	UGUAAUUUGUUCUGCCGATsT	18%	1%
ND-10448	615	CCGUTUUUGUUGUCUCCATsT	616	UGGAGCAUACAUAACGGGtsT	41%	1%
ND-10449	617	CCGGUUAAGUAAAGCCAGTsT	618	CUGCCUUUACUUAUACCCGGGtsT	23%	1%
ND-10450	619	GGUACCCGSAUUUAAAGATsT	620	UCUUUAAUUUCCGGGUACCTsT	14%	2%
ND-10451	621	GUUAUCCGACAGAACAAUtsT	622	AUUGUUCUGUCGGAUAGCTsT	24%	2%
ND-10452	623	UAUCCGACAGAACAAUtsT	624	UAUUUGUUCUGUCCGGAUtsT	12%	1%
ND-10453	625	UGCGCUAAGUCUCUUUUtsT	626	AAAAGACACUUAAGCCGCAtsT	46%	3%
ND-10454	627	GGGSAUUUUGGCGACUGCATsT	628	UGCAGUCCCAUAUUCGGCTsT	14%	0%

ND-10455	629	AUGUUAAGCCAUCAUCCUUtst	630	AGCAUGAUGGCUAGACAUTst	12%	2%
ND-10456	631	CUAGAGUAOCCGGAAUUtst	632	AAUUUOCCGGUACCUUAGTst	28%	2%
ND-10457	633	CCUUCGAGCCGUAGCGUst	634	CACSCUACGGCUCGACGGTst	27%	3%
ND-10458	635	CGGACAGAACAAUUAACtst	636	GUGUAUUUUUGUGCGGTst	39%	7%
ND-10459	637	AGUACCCGGAUUUAAGTst	638	CUUUAAUUUCCGGUAGCUtst	30%	3%
ND-10460	639	CAUCCAGGGUUUCUGCCTst	640	GGCAGGAACCCEUGCAUGTst	95%	6%
ND-10461	641	AGUUUGCGGCAACAACTst	642	GGUUUUUUUCCCGCAAGCUtst	94%	8%
ND-10462	643	ACUGCGCUAAGUCUCUUtst	644	AAAGASACUUAGCCGCCAGUtst	13%	2%
ND-10463	645	CAUCCCUUAGAACCCUGCUtst	646	AGCAGGGUUUCUAGGGAGUtst	18%	1%
ND-10464	647	ACCCGGUANGUANGGCAst	648	UGCCUUUACUUACCCGGUUtst	41%	1%
ND-10465	649	GAUUUUGGGACUGCACCAtst	650	UGGUGCAGUCGCCAUUAUCtst	23%	1%
ND-10466	651	CUCCGACAGCUCGUCUUCtst	652	GAAGACGAGCUUGUCGAGTst	14%	2%
ND-10467	653	GGUUUAUGCCGACUGCACTst	654	GUGCAUGCCCAUAUUCGCTst	24%	2%
ND-10468	655	AAUUACACCGUCAACACAtst	656	UGUUUUUGACGGUGUAAUUtst	12%	1%
ND-10469	657	AACUGCCGUUGAUGUGGst	658	CCACACAUCAACGGCAGUUtst	46%	3%
ND-10470	659	AACUGCGCUAAGUCUCUUtst	660	AAAGACUUUAGCCCGCAGUUtst	14%	0%

ND-10471	661	CCGCUAUAACAGGACAATsT	662	UUUCCUUGUUUUCAGGGTsT	12%	2%
ND-10472	663	AAGGUACACCCAGCAUGTsT	664	CAUGCCUGGUGUAACCCUUsT	28%	2%
ND-10473	665	CCGGUAAGUAAGGCAGATsT	666	UCUGCCUUUACUUUACCCGGTsT	27%	3%
ND-10474	667	CCAUJACAGGUCUCAUGTsT	668	CCAUAGACCCUGUAUGGGTsT	39%	7%
ND-10475	669	AUUUUGGCGACUGCACCAATsT	670	UUGGUCAGUCGCCAUJAAUsT	30%	3%
ND-10476	671	AUGLACGGUUUCUGCCCTsT	672	GGCAGGAACCCGUGCAUsT	95%	6%
ND-10477	673	CUAGCCUCCACAGUCCACTsT	674	GUGGACUGUGGAGGGCUAGTsT	43%	7%
ND-10478	675	CAGGUACCCGGAAUUJAAATsT	676	UUUAAUUUCGGGUACCUCTsT	11%	1%
ND-10479	677	AAUACAGCUCCUUCACCACTsT	678	GUGGUAAGGAGGUGUAUUsT	30%	3%
ND-10480	679	CACGGUUUCUCCAGCTsT	680	GUUGGCGAGGAACCCUGTsT	19%	1%
ND-10481	681	GGACUAGAUUUUCCCGUUsT	682	AACGGCAAGAUUCAGUCCTsT	14%	2%
ND-10482	683	CGUUUAUGUAUGCUCCAUUsT	684	CAUGGCGAUACAUAAACCTsT	15%	1%
ND-10483	685	GGGUACUCCUACUUAAGCTsT	686	GCUUAUAGUAGGUAUCCCTsT	11%	0%
ND-10484	687	UCGGUGUGUCUGUGUGTsT	688	CCACCACAGACAACCCGATsT	65%	5%
ND-10485	689	AAACUCCCGUUGAUGUGTsT	690	CACACAUCAACGGCAGUUsT	73%	6%
ND-10486	691	GGGAACUUGGAGCUUUUGATsT	692	UCAAGCUCCAAAGUUUCCTsT	8%	1%

ND-10487	693	GGCCCCGUCGAGCCCGUAGCTsT	694	GCUACGGGCUUGACGGGCGCTsT	26%	3%
ND-10488	695	GCGACAGAAUUAUACACCTsT	696	GGUGUAAUUGUUCUGUCCTsT	10%	2%
ND-10489	697	GCGACGGCUUAAAGCCAGCCTsT	698	GGCUGGCUUAAAGCCUGCCTsT	50%	1%
ND-10490	699	GACCCGGUAAAGUAAAGGCTsT	700	GCCUUUACUUACCCGGUUCTsT	74%	1%
ND-10491	701	UUUAUCACUCCGCCUUCUUCTsT	702	GAGAAGGCGGAGUGAUCAAATsT	80%	7%
ND-10492	703	UCUAGCCCUCCACAGUCCATsT	704	UGGACUUGUGGAGGGCUAGATsT	69%	4%
ND-10493	705	GUUUCACCAAGUCCGGAAATsT	706	UUCCGGCACUUGGUUCAAATsT	23%	3%
ND-10494	707	CUCAACUCCGACAAGCUCCCTsT	708	CGAGCUUGUCCGAGUUGAGTsT	45%	6%
ND-10495	709	CAACUCCGACAAGCUCCUUCTsT	710	GACGAGCUUGUCCGAGUUGTsT	23%	3%
ND-10496	711	ACCCGGAAUUAAGAGGATsT	712	UCCUUAUUAUUUCCGGGUTsT	13%	2%
ND-10497	713	CCCGAAUUAAGAGGAGTsT	714	CUCCUUAUUAUUUCCGGTsT	19%	1%
ND-10498	715	CACCACUCCUGGCCGCTsT	716	GCCGGCCACGAGAGUGGUGTsT	94%	11%
ND-10499	717	CGUCGAGCCCGUAGGUGTsT	718	CCACGCUACGGGCUCCGAGCTsT	13%	1%
ND-10500	719	GCUUGGGGACAAACCCCTsT	720	GGGUUGUUGUCCCGCAACCTsT	49%	2%
ND-10501	721	GAUUCAAACAGGGUCUGUUCTsT	722	GACAGACCGUUGUUGAUUUCTsT	18%	2%

ND-10502	723	GGCGAUUAUGGCGACUGCTsT	724	GCAGUGCCCAUAUCCGCTsT	8%	1%
ND-10503	725	CGAUUAUGGAGCUGCACTsT	726	GGUGCAGUCGCCAUAAUUGTsT	17%	1%
ND-10504	727	UCUGCUGGUUACUCACGAUtsT	728	AUUGUGAGUAACCAGCAGATsT	38%	4%
ND-10505	729	CUAUGCGGACAGAAAUUtsT	730	AAUUGUUUGUGCGGAUAGTsT	9%	1%
ND-10506	731	CAAUUACACCGUCACACTsT	732	GUUGUGACGGUGAAUUGTsT	11%	1%
ND-10507	733	ACCGUCAACAAGAGAAtsT	734	UUUCUUUGUUGACGGUtsT	9%	1%
ND-10508	735	CUCCUUGGUGUUGUCUGTsT	736	CACAGACAACACCGAGGATsT	78%	5%
ND-10509	737	GGAGUAGCCUCCACCCUGTsT	738	CAGGGUGAGGCUAOCUCTsT	18%	1%
ND-10510	739	GGAGAGUUUCUCACACCATsT	740	UGGUGUGAGAAACCUUCCTsT	13%	1%
ND-10511	741	CUGCCGUGAUGUGGGAGTsT	742	CUCCACACAUAACGGCAGTsT	19%	2%
ND-10512	743	UGCCGUUGAUGUGGAGTsT	744	CCUCCACACAUAACGGCATsT	82%	4%
ND-10513	745	AGAUGGUAAGGCUACAGTsT	746	CCUGAGCCUUACCCAUUtsT	24%	1%
ND-10514	747	AGACAGUAGCUAUGAAGTsT	748	CUUCAUCAGCUAUGUUCUtsT	15%	0%
ND-10515	749	GCGCUAAGUCUUCUUUtsT	750	GAANAAGAGACUAAGCCGCTsT	13%	1%
ND-10516	751	CCUAAAGAACCCGUGAUAAtsT	752	UUUAUCAGCGGUUCUUAAGTsT	6%	0%

ND-10517	753	GAACCGCUGAUAAACCAGGTsT	754	CCUGGUUAUCAGCGGUUUCTsT	13%	0%
ND-10518	755	AACCGCUGAUAAACCAGGACTsT	756	GUCCUGGUUAUCAGCGGUUUTsT	42%	2%
ND-10519	757	ACCGCUGAUAAACCAGGACATsT	758	UGUCCUGGUUAUCAGCGGUUTsT	11%	1%
ND-10520	759	CAAAGGGUACACGCAGGCATsT	760	UGCCUGCGUUAACCCUUGGTsT	19%	1%
ND-10521	761	CAAGGGUACACGCAGGCAUTsT	762	AUGCCUGCGUUAACCCUUGTsT	12%	0%
ND-10522	763	AGGGUACACGCAGGCAUGCTsT	764	GCAUGCCUGCGUUAACCCUTsT	23%	1%
ND-10523	765	GUACACGCAGGCAUGCAAGTsT	766	CGUGCAUGCCUGCGUGUACTsT	27%	1%
ND-10524	767	AGGCAUGCAACGGGUUUCCTsT	768	AGGAAACCCGUGCAUGCCUTsT	14%	0%
ND-10525	769	GGCAUGCACGGGUUUCUGTsT	770	CAGGAAACCCGUGCAUGGCTsT	18%	3%
ND-10526	771	ACGGGUUUCUGCCACAGGTsT	772	CGCUGGGCAGGAAACCCGUTsT	30%	1%
ND-10527	773	GAGCAGACCCGGUAAGUATsT	774	UACUUAACCCGGGUCUGUCTsT	24%	2%
ND-10528	775	AGCAGACCCGGUAAAGUAATsT	776	UUACUUAACCCGGGUCUGUCTsT	24%	2%
ND-10529	777	GGGUAAAGUAAAGGCAGACCTsT	778	GGUUCGCCUUAUUAUACCTsT	39%	3%
ND-10530	779	AGCUCUAUACCCGUGCCCTsT	780	AGGGCACGGGUAUGAGGCTsT	82%	5%
ND-10531	781	GUAAAGCUCUUGCCACAUTsT	782	AUGUGGCAGAAAGGUUACACTsT	13%	1%

ND-10532	783	AAAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	784	AAGCGGAGUGAUCAAUUUTsT	18%	2%
ND-10533	785	AAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	786	GAAGGGAGUGAUCAAUUUTsT	19%	0%
ND-10534	787	GCCUUGCGGUCAGGGACUGTsT	788	CAGUCCUUGACCGCAAGGCTsT	12%	1%
ND-10535	789	CUUGCGGUCAGGGACUGAATsT	790	UUCAGUCCUUGACCGCAAGTsT	11%	0%
ND-10536	791	UUGCGGUCAGGGACUGAUTsT	792	AUUCAGUCCUUGACCGCAATsT	12%	0%
ND-10537	793	AUGUAUGCUCCAUGUCUAGTsT	794	CUAGACAUGGAGCAUACAUTsT	21%	1%
ND-10538	795	AGCAAAGUAGGCAGGACUCTsT	796	GAGUCCUUGCCUACUUGCUTsT	19%	1%
ND-10539	797	CAGCCCAUACCAGGUUCUCATsT	798	UGAGACCUGGUUUGGGCUGTsT	27%	2%
ND-10540	799	CAGCCGUCGGACCUUGCGTsT	800	CCGCAGGUCCGGACGGCUGTsT	44%	4%
ND-10541	801	GGCCCGUCGAGCCCGUAGTsT	802	CUACGGGCUUGACGGGCCCTsT	71%	6%
ND-10542	803	CGUAGCGUGGCCUCCAGCUTsT	804	AGCUGGAGGCCACGCUAOGTsT	84%	9%
ND-10543	805	GGUGAGGGAGUGGUACCGCTsT	806	GCGGUACCAUCUCCUACCTsT	108%	8%
ND-10544	807	AAAGUACACACAGCAGGUGTsT	808	CACCUGCUGUGUGUACUUUTsT	140%	7%
ND-10545	809	CCAGGUUGACUUCUCCUCATsT	810	UGAGGAGAAAGUCAACCUGTsT	18%	2%
ND-10546	811	UGUUUACACCAAGUGCCGGATsT	812	UCGGGCACUUGGUGAAAACATsT	31%	2%

ND-10547	813	UGCUGGUUACUCACGAUGGTsT	814	CCAUCGUGAGUAACCAGCATsT	144%	10%
ND-10548	815	UCCUCGGUUGUUGUGUGGTsT	816	CCACAGACACACACCCAGGATsT	106%	14%
ND-10549	817	AGGUAGCCUCCACCUGGCTsT	818	GCCAGGGUGGAGGCUACCUTsT	74%	15%
ND-10550	819	GCCGUUGAUUGUGGAGGCTsT	820	CCUCCACACAUCAACGCCTsT	26%	4%
ND-10551	821	GAUGGUAAAGGCTCAGGATsT	822	UCCUGAGCCUUACCCAUCTsT	22%	1%
ND-10552	823	CCCAACTGCCGCUAAGUCUTsT	824	AGACUUAGCCCCAGUUGGCTsT	18%	2%
ND-10553	825	CCAAGCGAAACUUGGAGCUTsT	826	AGUCCAAGUUUGCUUGGTsT	16%	1%
ND-10554	827	GGGUACACGACGCAUGCATsT	828	UGCAUGCCUUGCGUGUACCCCTsT	19%	2%
ND-10555	829	UGCACGGGUUUCUUGCCCATsT	830	UGGGCAGGAACCCGUGCATsT	28%	2%
ND-10556	831	CUCCUCUAGCCUCAUACCCCTsT	832	GGGUUGAGGCUAGAGGAGTsT	109%	8%
ND-10557	833	UCCUCUAGCCUCAUACCCGTsT	834	CGGGUUGAGGCUAGAGGATsT	117%	7%
ND-10558	835	UCUAGCCUCAUACCCUGCTsT	836	GCACGGUUAUGAGGCUAGATsT	128%	9%
ND-10559	837	UUCAUACCUCAUCAUGUCUTsT	838	AGACAUGUAGAGGUUAUAAATsT	52%	4%
ND-10560	839	UCUACAUUGUCUUGAGATsT	840	UCUCAAGCAGACAUUGUAGATsT	15%	2%
ND-10561	841	AUAUUUCCUCAAGCCUGAAATsT	842	UUUCAGGCTUGAGGAUAUATsT	15%	2%

ND-10562	843	AACUCCUUAUGCAUCOCUUUAUATsT	844	UAAGGGAUGCAUAGGAGUUTsT	14%	1%
ND-10563	845	GCAUCCUUUAGAACCUCUGCTsT	846	GCAGGGUUCUUAAGGGAUGCTsT	20%	1%
ND-10564	847	UGAUCACUUCGCGCCUUCUCCTsT	848	GGAGAAGCGCGGAGUUAUCATsT	67%	7%
ND-10565	849	UGUAAGUGCCUUGCGGUCATsT	850	UGACCCGAAGGCACUUUACATsT	17%	2%
ND-10566	851	CCUUGGGUCAGGGACUGATsT	852	UCAGUCCUCUGACCGCAAGGTsT	14%	1%
ND-10567	853	AAUCUUGCCCGUUUAUGUATsT	854	UACAUAAACGGGCAAGAUAUUsT	13%	2%
ND-10568	855	CCGUUUUAUGUAUGCUCCAUUsT	856	AUUGGCAUACAUAAACGGTsT	19%	6%
ND-10569	857	UGUAUGCUCCAUUGUCUAGCTsT	858	GCUAGACAUUGGAGCAUACATsT	87%	13%
ND-10570	859	CAUGUCUAGCCCAUUCUCCTsT	860	GGAUGAUGGGCUAGACAUGTsT	33%	4%
ND-10571	861	AGUAGCGAGGAGCUCAAUAUsT	862	UAUUAGCUCUCCUCCUAUCUsT	11%	1%
ND-10572	863	CCUACAGGUACCGGAAUAUsT	864	AUUUCGGUACCUUGUAGGTsT	22%	3%
ND-10573	865	CCCGUCGAGCCCGUAGCGUsT	866	ACGCUAGCGGCUCCGACGGGTsT	23%	1%
ND-10574	867	GCGGUAGGGAGUGGUACCTsT	868	GGUACCAUCCUCCACCCCTsT	30%	1%
ND-10575	869	UUUAUGGCAUCUGCAACCAAGTsT	870	CUUGUGCAUGUCGCCAUUAUsT	77%	6%
ND-10576	871	CUUAUAGCUCCAGGUUGACTsT	872	GUCAACCUUGGAGCUUAUAGTsT	11%	1%

ND-10577	873	UAUAAGCUCCAGGUUGACUTsT	874	AGUCAACCTGGAGCUUAUATsT	42%	8%
ND-10578	875	AGGUUGACUUCUCCUCAGATsT	876	UCUGAGGAGAAAGUCAACCUtsT	13%	3%
ND-10579	877	CUGGGCUUUUCACCAAGUTsT	878	ACUUGGUUAACAGCCCAAGTsT	19%	6%
ND-10580	879	AACAAUUACACCCGUAACATsT	880	UGUUGACGGUUAUUUUUtsT	13%	1%
ND-10581	881	UGGUUAAGGGUCUCAGGAAGTsT	882	CUUCCUGAGCCCUUACCCATsT	20%	3%
ND-10582	883	GGGUAGGGUCUCAGGAAGTsT	884	ACUUCUUGAGCCCUUACCCtsT	22%	3%
ND-10583	885	CACCCAACTGGCGCUAAGUTsT	886	ACUUAGCGCGAGUUUGGUGTsT	22%	10%
ND-10584	887	ACCCAACTGGCGCUAAGUCTsT	888	GACUUAGCCCGAGUUUGGUTsT	22%	5%
ND-10585	889	CCAACUGCGCUAAGUCUCTsT	890	GAGACUUGAGCCCGAGUUGGTsT	14%	2%
ND-10586	891	CUUGGAUCAGCCAAAGCAATsT	892	UUUGCUUGGCUUAGUCCAAAGTsT	15%	1%
ND-10587	893	GCCAAAGCAACUUGGAGCTsT	894	GCUCCAAGUUUUGCUUGGCTsT	17%	2%
ND-10588	895	UCCUAAAGAAACCGCUGAUATsT	896	UAUCAGCGGUUUUUAAGATsT	11%	2%
ND-10589	897	GCAUGCAGGGUUUCCUGCTsT	898	GCAGGAACCCCGUUGCAUGCTsT	24%	8%
ND-10590	899	UGUUACUUAGGCAAUUCCCTsT	900	GGGAUUUGCCUUAAGUUAACATsT	48%	10%
ND-10591	901	CUAGGGCUAGAGCAGACCCCTsT	902	GGGUCUGCUUAGCCCUUAGTsT	58%	10%

ND-10592	903	CUCUAGCCUCAUACCCGUGTst	904	CACGGUUAUGAGCCUAGAGTst	34%	5%
ND-10593	905	UUAGAACCUCUCACAGACATst	906	UGUCUGAGCAGGGUUCUUAATst	14%	1%
ND-10594	907	UGUGAACGCUUCUGCCACATst	908	UGUGCAGAGGCUUCACATst	15%	0%
ND-10595	909	AUUGAUCACUCCGCCUUCUTst	910	AGAAGCCGGAGUGAUAUst	43%	1%
ND-10596	911	UCACUCCGCUUCUCCUGGst	912	CCAGGAGAAAGCGGAGUGATst	90%	5%
ND-10597	913	GCGGUCAGGGACUGAAUCUTst	914	AGAUUCAGUCCUGACCCGCTst	11%	0%
ND-10598	915	GGUCAGGGACUGAAUCUUGTst	916	CAAGAUUCAGUCCUUGACCTst	13%	1%
ND-10599	917	GUUAGCUCCAUUGUCUAGCCCTst	918	GGCUAGACAUGGAGCAUACTst	28%	3%
ND-10600	919	CCAUUGUCUAGCCCAUCAUCTst	920	GAUGAUGGGCUUAGACAUGGTst	12%	1%
ND-10601	921	GAUCGAGUCCACCCGUCCCTst	922	GGAGCGGUGGAACUCUGAUCTst	17%	1%
ND-10602	923	GGACUCUAGCCUCCACAGTst	924	CUUGGAGGGCUUAGAGUCCCTst	41%	4%
ND-10603	925	UCACCACUCUCUGGGCGGst	926	CCGGCCACGAGAGUGGUGATst	83%	3%
ND-10604	927	CAGCUUGCGGACAACAACst	928	GUUGUUGUCCCGCAAGCUGTst	21%	1%
ND-10605	928	CAUCUUCUUCUCCGGCCCTst	930	GGCCCGGGAUAGAGAUCTst	26%	2%
ND-10606	931	AUAAGCUCCAGGUUGACUUTst	932	AAGUCAACCUGGAGCUUAUst	15%	1%

ND-10607	933	CUGCUGGUUACUCACGAVGTsT	934	CAUCGUGAGUAACCAGCAGTsT	85%	8%
ND-10608	935	GAACAUAUACACCGUCAACTsT	936	GUUGAOGGUGUAUUGUUCTsT	13%	1%
ND-10609	937	AUUACACGGUCAACAACAAsT	938	UUUUUUUGACGGUGUAUUsT	12%	0%
ND-10610	939	CUGUGGUUCGGCUCUCGGTsT	940	CCGAGGAGCGGAACACAGTsT	53%	2%
ND-10611	941	GAAGUGCCUUGGCUCACAGTsT	942	GCUGGAGCCAAAGCAUUCTsT	24%	3%
ND-10612	943	GAUCAGCCAGCGAACAACUUsT	944	AAGUUUCGUUGGUGAUCTsT	12%	0%
ND-10613	945	AGAAACCGCUGAUAACCAGTsT	946	CUGGUUAUCAGCGGUUUCUsT	12%	1%
ND-10614	947	UGAUAAACCAGGACAAAACAsT	948	UGUUUUGUCUGGUUAUCAUsT	7%	1%
ND-10615	949	CACGCAGGCAUGCAOGGGUsT	950	ACCCGUGCAUGCCUGGUGTsT	12%	0%
ND-10616	951	GCUCUCCAGUAGCACAGAUTsT	952	AUCUGUGCUACUGSAGAGTsT	9%	1%
ND-10617	953	CAGACCCGGUAAGUAAGTsT	954	CUUUUACUUACCCGGUCUCUsT	55%	3%
ND-10618	955	AGACCCGGUAAGUAAGTsT	956	CCUUUACUUACCCGGUCUCUsT	72%	8%
ND-10619	957	AUCACUCGGCUCUCCUGTsT	958	CAGGAGAAGCGCGAGUGAUTsT	63%	6%
ND-10620	959	CACUCGGCUCUCCUGGGTsT	960	CCCAGGAGAGGGCGGUGTsT	28%	1%
ND-10621	961	AACUAGACUGUAANGCUCUsT	962	AGGCACUUACAGUCUAGUUsT	23%	1%

ND-10622	963	UAUGCUCCAUGUCUAGCCCTsT	964	GGGCUAGACAUGGAGCAUATsT	98%	2%
ND-10623	965	CCCGAUGUAUGGAAACUGCTsT	966	GCAGUUUCCAUACAUCGGGtsT	11%	1%
ND-10624	967	GUACUGCUACTUAUAGCUCTsT	968	GAGCUUAUAGUAGCAGUACTsT	19%	1%
ND-10625	969	AGGUGACCAGCUACCAGCTsT	970	GCUGGUAGCUGGUCACGGCUTsT	49%	2%
ND-10626	971	ACAAUUACACCGUCAACAATsT	972	UUGUUGACGGUGUAUUUGTsT	8%	0%
ND-10627	973	AUGCUCUCCUGGUGGAGGtsT	974	CCUCCACCACAGAGGAGCAUTsT	76%	5%
ND-10628	975	AACAGUAGCUGAUGAAGCUTsT	976	AGCUUCAUCACGUACUGUUTsT	22%	1%
ND-10629	977	CUGACUCCCGAGGGCUAGTsT	978	CCUAGCCUCCGGGAGUCAGTsT	34%	2%
ND-10630	979	GUGCAACCAGAACAAUUCGsT	980	CGAUUUGUUCUGGUUGCACtsT	10%	1%
ND-10631	981	UGCAACCAGAACAAUUCGtsT	982	CCGAUUUGUUCUGGUUGCATsT	48%	4%
ND-10632	983	CUUCAAGUACACACAGCATsT	984	UGCUUGUGUAGUACUUUGAAGTsT	20%	1%
ND-10633	985	CAGCGUGACCAGCUACCAGTsT	986	CUGGUAGCUGGUCACGGCUGTsT	35%	1%
ND-10634	987	AGAACAAUUACACCGUCAATsT	988	UUGACGGUGUAUUUGUUCUTsT	14%	0%
ND-10635	989	GAUAACCAGCACAAACACTsT	990	GUGUUUGUCUCCUGGUUAUCTsT	11%	1%
ND-10636	991	ACAACCAAGGGUACACGCATsT	992	UGCUGUACCCUUGGUUGUTsT	17%	1%

ND-10637	993	CCCAGGACGGCUIUAAAGCCTst	994	GGCUUAAAGCCGUGUGGGTst	27%	2%
ND-10638	995	CUCCGAGGGCUAGGGCUATst	996	UAGCCUAGCCUCCGGAGTst	23%	1%
ND-10639	997	UAGAACCUCUCAGACACTst	998	GUGUCUGAGCAGGGUUCUATst	35%	2%
ND-10640	999	CCUGGCUGUUUCAOCCAAAGTst	1000	CUUGGUGAAACGCCAGGTst	14%	1%
ND-10641	1001	GGUACAGCCAAAGCGAAACUTst	1002	AGUUUCGCUUGGCUGAUCCCTst	16%	3%
ND-10642	1003	AAGAAACCGCUGAUAAACCATst	1004	UGUUUAUCAGCGGUUCUUTst	17%	1%
ND-10643	1005	ACCAAGGGUACACGGCAGCTst	1006	GCCUGCGUGUACCCUUGGUTst	37%	4%
ND-10644	1007	GUAGCACAGAUUCUCUGCUCtst	1008	GAGCAGACAUCUGUGCUACTst	13%	3%
ND-10645	1009	UUUCAUAOCUCUACAUGUCtst	1010	GACAUUGUAGAGGUUUGAAATst	88%	8%
ND-10646	1011	CCNACCAUCUGCCAGAGAAATst	1012	UUUCUUGGCAGAUUGGUTst	16%	2%
ND-10647	1013	GUCAGGGACUGAUAUCUUGCTst	1014	GCAAGAUUCAGUCCUGACTst	16%	3%
ND-10648	1015	AGCAUGAUCAAAGGAGUGUGtst	1016	CACACUCCUUGAUCUAGUCUTst	50%	7%
ND-10649	1017	GCAGCGUACCCAGCUACCATst	1018	UGGUAGCUGGUCACCCUGCTst	40%	6%
ND-10650	1019	CAGUCUCUGCUGGUUACUTst	1020	AGUAAACCAGCAGAGAGCUGTst	56%	5%
ND-10651	1021	GUUCGGCUCUCGGUGUUGTst	1022	CAACACCCGAGGAGCCGAACTst	68%	5%

ND-10652	1023	GCAGAUUCUCCUGGUGTst	1024	CCACCAGAGCAUCUGCTst	26%	5%
ND-10653	1025	AGGAAGUUGCUCCAAGAACTst	1026	GUUCUUGGAGCAACUCCUst	18%	2%
ND-10654	1027	AAGCUUCUGCCACAUUst	1028	AAGAUGGCGCAGGCGUst	18%	1%
ND-10655	1029	CACUUGGCGUUIUCCACATst	1030	UGGIGAAACAGCCAGGUGTst	17%	2%
ND-10656	1031	AAGCAUGCAGCGUGACATst	1032	UGGUCACGCGUCAUUGCUst	27%	3%
ND-10657	1033	CGAGGCUAGGGCUAGAGCTst	1034	GCUCUAGCCCUAGCCUCCst	30%	1%
ND-10658	1035	GGAAACCCUGGACAGAUst	1036	AAGUCUGUCCAGGGUUCCst	14%	1%
ND-10659	1037	GUAGCUGAUGAAGCUGCCCTst	1038	GGGCAGCUUCAUCAGCUACTst	19%	1%
ND-10660	1039	UCUUUUCCUUGGAUCAGTst	1040	CUGAUCCAAAGGAAAGATst	88%	4%
ND-10661	1041	CUCCAGUAGCACAGAUUst	1042	GACUUCUGUGUACUGGAGTst	10%	1%
ND-10662	1043	CCAAAUUUGAUCACUCCGCTst	1044	GCGGAGUGAUCAAUUUGGst	25%	3%
ND-10663	1045	CAGACCACUUGGCGUst	1046	AAACAGCCAGGUGGUCUGst	24%	2%
ND-10664	1047	CCUUCCCAUAGACUGUst	1048	ACAGUCUAGUUGGAAAGGst	15%	2%
ND-10665	1049	CGCAGCGUCCGACUCCGCTst	1050	GCAGGCGCGACGCGUGCTst	45%	2%
ND-10666	1051	UUUCACACCAAGGCAGAUst	1052	AUCUGCCUUUGGUGAGAAst	25%	2%

ND-10667	1063	CACCACCAUCCACGGCCCTsT	1054	GGCGCGUGGAUUGGUGTsT	35%	3% 4%	2da detección de dosis única @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10668	1055	CCAUUACUUUUGUGAACGCTsT	1056	GGUUCACAAAAGUAUUGTsT	19%	16%		2%
ND-10669	1057	CCAAGAACAGUAGCUGAUGTsT	1058	CAUCAGCUACUGUUCUUGTsT	23%	4%		1%
ND-10670	1059	AGGAGAGGUUUCACACCTsT	1060	GGUGUGAGAAACCUCUCCUTsT	18%	3%		2%
ND-10671	1061	AUCAUCCUGCUUGGAGCAATsT	1062	UUCCUCCAAGCAGGAUGTsT	33%	3%		4%
ND-10672	1063	GCAUCACAGACAGACGCUTsT	1064	AGCGUCUGCUCUGUGAUGTsT	29%	2%		3%
ND-10673	1065	AGGAGUAGCCUCCACCCUUsT	1066	AGGGUGGAGGCUACCUCUUsT	63%	6%		
ND-10674	1067	ACAACCGCAUGANGACGGCTsT	1068	GCCGUCUUCAUUGCGGUUGTsT	94%	2%		1%
ND-10675	1069	GCAUGAAGACGGCCUUCUGTsT	1070	CAGAAAGCCGUCUUCUUGTsT	20%	2%		4%
ND-10676	1071	GUCACGAUGGUCACCCUCCTsT	1072	GGAGGGUGACCAUCGUGACTsT	66%	5%		1%
ND-10677	1073	CCCUGCUCACACACCAUUATsT	1074	UAAUUGGUCUCUGACGAGGsT	15%	3%		

ND-10678	1075	UCACGAUGGUCACCCUUCU ^T T ^T	1076	AGGAGGGUGACCAUCUGAT ^T T ^T	80%	6%	70%	4%
ND-10679	1077	UCAACCUCAACUUGGACAA ^T T ^T	1078	UUGUCCGAGUUGAGGUUGAT ^T T ^T	20%	3%	21%	1%
ND-10680	1079	UGACCAGCUACACAGCUUC ^T T ^T	1080	GAGAGCUGGUAGCUGGUCAT ^T T ^T	88%	22%	77%	5%
ND-10681	1081	GAUGGCCUUGGUGACAUC ^T T ^T	1082	GAUUCACCGAGGGGCCAUC ^T T ^T	88%	18%	60%	4%
ND-10682	1083	GCUUUGACAAGGAACUUUC ^T T ^T	1084	GANAGUUCCUUUGUCAAA ^T T ^T	19%	7%	14%	2%
ND-10683	1085	CGAUACTUGSUUCCAGGOC ^T T ^T	1086	GGCCUUGGAGACCAGUAUC ^T T ^T	27%	5%	27%	2%
ND-10684	1087	UCUGGATGUCUUCCAU ^T T ^T	1088	GGCATTGGAAACACAUC ^T T ^T	92%	13%	89%	3%
ND-10685	1089	CAGGACCCUAGAACUUCU ^T T ^T	1090	GCAGAGGUCUAGGGUCCU ^T T ^T	58%	14%	50%	2%
ND-10686	1091	GACCCUAGACCUUCGAC ^T T ^T	1092	GCUGCAGAGGUCUAGGGU ^T T ^T	27%	2%		
ND-10687	1093	ACCUAGACCUUCGACGOC ^T T ^T	1094	GCCUCCAGAGGUCUAGGG ^T T ^T	21%	1%		
ND-10688	1095	CAGCCCAOCCGCGGAGGT ^T T ^T	1096	CCUCCUCCGCCUGGGCU ^T T ^T	55%	4%		
ND-10689	1097	CUCUUGGAGUUCUUCGAT ^T T ^T	1098	UGCAGAAAGAACTUGAAG ^T T ^T	13%	3%		
ND-10690	1099	UUGGCAUGAUGUACUGGC ^T T ^T	1100	UGCCAGUACAUCAUCCAA ^T T ^T	16%	2%		

ND-10691	1101	GGC AUG AUG UAC UGG CCA A U T s T	1102	A U T G C C A G A G U A C A U C A U G C C T s T	13%	1%
ND-10692	1103	U G U A C U G G C A A U U C G C C U T s T	1104	A G C C C G A A U T G C C A G U A C A T s T	45%	2%
ND-10693	1105	A C U G G C A A U U C G C C U G C U T s T	1106	A G C A G C C G A A U T G C C A G U T s T	38%	3%
ND-10694	1107	G G C A A U U G G C C U G C U U U U T s T	1108	A A A A G C A G C C G A A U U G C C T s T	10%	1%
ND-10695	1109	C A A U U G G C C U G C U U U C G T s T	1110	C G A A A G C A G C C G A A U U G T s T	12%	1%
ND-10696	1111	U C G G A G A G U A C U C A G C U A T s T	1112	U A G C U G A A G U A C U C U C C G A T s T	12%	1%
ND-10697	1113	C A A C A U C C U G U C G A G C U G T s T	1114	C A G C C U C G A C A G G A U G U U G T s T	35%	7%
ND-10698	1115	C A U C C U G C A G C C U G C C A T s T	1116	U G G C A G C C U C G A C A G A U G T s T	26%	6%
ND-10699	1117	U C C U G C A C C A G C G C A A U U T s T	1118	A A U U C C C U G G U U G C A G G A T s T	28%	6%
ND-10700	1119	G G A A A C U G C U A U A C U U C A T s T	1120	U G A A A G U A U A G C A G U U C C T s T	7%	2%
ND-10701	1121	A C G S U C U G U C C C U G A U G C U T s T	1122	A G C A U C A G G C A C A G A C C C G U T s T	28%	7%
ND-10702	1123	G U U C U G U C C C U G A U G C U G C T s T	1124	G C A G C A U C A G G C A C A G A C C T s T	33%	2%
ND-10703	1125	G G C C C G G G U A A U G G U G C A C T s T	1126	G U G C A C C A U U A C C C G G G C C T s T	47%	10%
ND-10704	1127	C A G G A U G A A C C C U G C U U A T s T	1128	U A A A G G C A G G U U C A U C C U G T s T	59%	2%
ND-10705	1129	G A U G A C C U G C C U U A U G G T s T	1130	C C A U A A A G G C A G G U U C A U C T s T	77%	7%
ND-10706	1131	G G U G G C U U A A C U U G C G C T s T	1132	G C G C A A G U A A A A G C C A C C T s T	47%	8%

ND-10707	1133	GUGCCUUAAACUUGCCGCCCTST	1134	GGCCGCANGUUAAAGCCACTST	17%	2%
ND-10708	1135	UUGGGCCUUGCCGUGGAGATST	1136	UCUCCAGCCAGGCGCGCAATST	52%	3%
ND-10709	1137	UGGGCCUUGCCGUGGAGACTST	1138	GUUCUCAAGCCAGGCGCGCATST	81%	4%
ND-10710	1139	CGGCCUUGCCGUGGAGACTST	1140	GGUCUCCAGCCAGGCGCGCTST	57%	4%
ND-10711	1141	CAGGUGUGUAUUCACUCCUUTST	1142	AGGAGUGAAUACACACCUCUUTST	24%	2%
ND-10712	1143	GUGUAUUCACUCCUUGCUUUTST	1144	GAAGCAGGAGUGAAUACACTST	20%	1%
ND-10713	1145	GGCCUUGCCGUGACAUCCCATST	1146	UGGGUUGUCACCCAGGGCCCTST	40%	3%
ND-10714	1147	GAUGCUAUGCCGACAGAACTST	1148	GUUCUGCGCGAUACCAUUCTST	24%	2%
ND-10715	1149	ACUACAAACCAAUUCUUCATST	1150	UCAGAAUUGGUUUUGUAGUUTST	19%	2%
ND-10716	1151	CAAUUCUGAGUCUCCUUCUUTST	1152	AGAGGAGACUCAGAAUUGCTST	35%	3%
ND-10717	1153	CUUCUGACGAUGGUCACCTST	1154	GGUGACCAUCGUGACAGACTST	41%	4%
ND-10718	1155	CUGCUCCGAGGUUCCGAAATST	1156	UUCCGAAACUUCCGAGCCACTST	16%	3%
ND-10719	1157	AGUUCCGAAAGCCGAUACUUTST	1158	AGUAUCCGGCUUCGAAACCUUTST	16%	2%
ND-10720	1159	GUCCGAAAGCCGAUACUUGGTST	1160	CCAGUAUCCGCUUCGGAACCTST	21%	2%
ND-10721	1161	CGAAGCCGAUACUGGUCUUTST	1162	GAGACAGUAUCGGCUUCGCTST	16%	1%
ND-10722	1163	AAGAUUGAAGGGAUGUGCAGTST	1164	CUGCACAUCCUUCAAUUCUUTST	25%	2%

ND-10723	1165	GAUUGAAGGAUUGGCAGGGTsT	1166	CCUUGCACAUCUCCUUAUUCTsT	26%	1%
ND-10724	1167	UGCCUCUGAACACUCUGGUTsT	1168	ACCAGAGUGUUCAGAGGCATsT	45%	3%
ND-10725	1169	CCUCUGAACACUCUGGUUUTsT	1170	AAACCAGAGUGUUCAGAGGGTsT	15%	2%
ND-10726	1171	GACAAGGAACUUCUUAAGTsT	1172	CUUAGGAAGUUCUUGUCTsT	105%	14%
ND-10727	1173	CAGGACAAACACACACCAATsT	1174	UUGGUUGUGUUDUGUCCUGTsT	32%	5%
ND-10728	1175	AACACAACCAAGGGUACACTsT	1176	GUGUACCCUUGGUUGUUGUTsT	60%	13%
ND-10729	1177	UUGAACUUGGGUUGGAAACTsT	1178	GUUUCACCACCCAAAGUUCATsT	23%	8%
ND-10730	1179	UGAACUUGGGUUGGAAACCTsT	1180	GGUUUCCACCCAAAGUUCATsT	18%	4%
ND-10731	1181	ACCGUGCCUUCACAGAGCTsT	1182	GCUCUGAGGGCAOCCGGGUTsT	19%	1%
ND-10732	1183	ACUUAACAUCUCCUGGAGTsT	1184	CUCCAGCAGAUUUUAUAGUTsT	17%	5%
ND-10733	1185	AUCUGUGGAGUUGUGUGTsT	1186	CAGCAACACUCCAGCAGAUTsT	119%	20%
ND-10734	1187	CUUGGAGUGUUGUGUUTsT	1188	AACAGCAACACUCCAGCAGTsT	58%	13%
ND-10735	1189	CUAGCCAUCAUCCUGCUUTsT	1190	AAGCAGGAUGUUGGCUUAGTsT	20%	6%
ND-10736	1191	CUUGGAGUCUUCUUAUGCTsT	1192	GCAUGGAAGACAUCCAGAGTsT	28%	8%
ND-10737	1193	AGCAGGACCCUAGAACUUCUTsT	1194	AGAGGUUAAGGGUUCUGCUTsT	36%	2%

ND-10738	1195	UUOGAGUUCUUCUGCAACATST	1196	UGUUGCAGAAAGAUCCGAAST	13%	1%
ND-10739	1197	CACCAUCCACGGGGCAUCTST	1198	GAUGGCCCCUGGALUGUG7ST	13%	2%
ND-10740	1199	CCACGGGCCAUCCGGCCUG7ST	1200	CAGGCGGAGUCCGCGGUGG7ST	44%	4%
ND-10741	1201	CAGCACACCGCAUGAAGATST	1202	UCUUCAUCCGGUUGUCUC7ST	23%	3%
ND-10742	1203	CCUUUGGCAUGAUGUACU7ST	1204	CAGUACAUCAUGCCAAAG7ST	12%	1%
ND-10743	1205	AUCCUUGCGAGGCCAGTST	1206	CUGGCAGCCUCGACAGGATST	14%	3%
ND-10744	1207	UCUCUGCAACCAGGCGAATST	1208	UUCCGCTUGUUGCAGGAGATST	12%	1%
ND-10745	1209	UGCAACCAGGCGAUUACU7ST	1210	AGUAAUUGCCUUGGUGCATST	45%	5%
ND-10746	1211	ACCUCCAUCCAGCAUGAGATST	1212	UCCUCAUCCUGAUGGAGGUTST	82%	7%
ND-10747	1213	GCGACUGCCACCAGAAUG7ST	1214	CCAUUCUUGGUGCGAGUCGCTST	82%	19%
ND-10748	1215	ACCAAGAUGGCCAGUGAUCTST	1216	CATCACUGCCAUUCUUGGUTST	54%	18%
ND-10749	1217	UGGUUACUCCAGUCCGCTST	1218	GGCCCAUCCUGAGUAAACATST	45%	7%
ND-10750	1219	AGAAUUGGAGUGGCCAAAG7ST	1220	CUUUGCCACUCCAUUCU7ST	11%	3%
ND-10751	1221	GGAGCUGAACTUACAAAACCTST	1222	GGUUUUGUAGUUCAGCUCC7ST	15%	3%
ND-10752	1223	CCUCUUCACGAGUGGUCACTST	1224	GUACCAUCCUGACAGAG7ST	18%	5%
ND-10753	1225	AGAUUGAAGGAAUGCCAGG7ST	1226	CCUGCACAUCCUICAAUCU7ST	26%	3%
ND-10754	1227	GAGCUUUGCAACGAACUUTST	1228	AAGUUCUUGUCAAAGGUC7ST	14%	2%

ND-10755	1229	CUUUUGACAAGGAACUUUCCCTst	1230	GGAAAGUUCUUGUCAAAAGTst	50%	8%
ND-10756	1231	UCAGACACCAUUAACUUUUGTst	1232	CAAAAGUAUUGGUGUCUGATst	32%	4%
ND-10757	1233	AGCACACUAUAACAUCUGCTst	1234	GCAGAUGUUUAUAGUGUGCUTst	11%	2%
ND-10758	1235	GCACAACCCCAUUGAAGACGTst	1236	CGUCUUCAUUGCGUUGUGCTst	34%	3%
ND-10759	1237	ACUGCUUCUACCAGACAUATst	1238	UADGUCUGGUAAGAAGCAGTst	11%	1%
ND-10760	1239	GAAGAOGCCUUCUGGGCATst	1240	UGCCAGAAAGGCGUUCUUTst	16%	2%
ND-10761	1241	AAGACGGCCUUCUGGGCAGTst	1242	CUGCCAGAGGGCGUCUUTst	58%	21%
ND-10762	1243	ACAUCMACCUACAUCGGATst	1244	UCCGAGUUGAGGUUGAUGUTst	14%	3%
ND-10763	1245	UGGAAGGACUUGGAAGAUGCTst	1246	CGAUCUUCAGUCCUUCCTst	108%	29%
ND-10764	1247	ACAUCUUGUOGAGGCCUCCst	1248	GCAGCCUUCGACAGGAUGUTst	101%	13%
ND-10765	1249	CAACCGCGAAUUAUCUUTst	1250	AGAGUAAUUGCCUUGGUTst	19%	5%
ND-10766	1251	CAGGCGAAUUAUCUUCACUTst	1252	AGUGAGAGUAAUUCGCCUUTst	24%	4%
ND-10767	1253	AGCAGAAUGACUUAUCUUTst	1254	GGAAUGAAGUUAUUCUGCUTst	40%	8%
ND-10768	1255	AUGAUGGUGGCUUUAACUUTst	1256	AAGUUAAGGCCACCAUCAUTst	85%	8%
ND-10769	1257	AGAACCUIUACCCUUCAAATst	1258	UUUGAAGGGUAAAGGUUCUTst	22%	4%
ND-10770	1259	CCUUUACCCUUCAAAGUACTst	1260	GUACUUAAGAGGGUAAAGGTst	21%	4%

ND-10771	1261	GAGCGUGUUGGCUUCCUCTCTCT	1262	GGAGCGAACCACAGGCUCTCTCT	28%	1%
ND-10772	1263	UGGUACUGCCUCUGAACACTCT	1264	GUUUUCAGAGGCAGUACCATCT	58%	4%
ND-10773	1265	CUCUAACCCGUGCCGICACTCT	1266	GUAGGGCCAGCGGUUAGAGCTCT	15%	2%
ND-10774	1267	CCGUAGCACACUAUAACAUTCT	1268	AUCUUADAGUUGGUUACGGCTCT	24%	6%
ND-10775	1269	CGUAGCACACUUAACAUCCTCT	1270	GAUGUUUAUGUGUGUCUACGCTCT	21%	4%
ND-10776	1271	GCAGGACCCUAGACCCUCUCTCT	1272	CAGAGGUCUAGGUCUUCUCTCT	25%	4%
ND-10777	1273	GCCUGCUUUUCGGAGAUATCT	1274	UACUCUCCGAAAAGCAGGCTCT	18%	4%
ND-10778	1275	GGGCCGGGUUAUUGGUGCACTCT	1276	UGCACAUUUUACCCGGGCCCTCT	16%	2%
ND-10779	1277	CAACACAGAGAAUUGCATCT	1278	UCCAUUUUCUUGUUGUUGCTCT	17%	0%
ND-10780	1278	GCUGUUGCACCAUACUUCUCTCT	1280	GAAGUUAUGGUGCANCAGCTCT	14%	1%
ND-10781	1281	CUACCGAGAGGCUUCUGAGCTCT	1282	CUCGAAGAGGCUUCGSHAGCTCT	24%	3%
ND-10782	1283	ACCUGCCUUUUAUGGUAUATCT	1284	AUCCAUUCCAUAAAAGCAGGCTCT	115%	10%
ND-10783	1285	UUGCAAGGAACTUUCUUAATCT	1286	UAGGAAGUUCUUGUUCAACTCT	16%	1%
ND-10784	1287	GCUGGAGUGUGUCUGUUGCTCT	1288	GGAACAGCAGCAGUCCAGCTCT	12%	1%
ND-10785	1289	UCGGUAGCAUCCAGGAUATCT	1290	AUUCUUGGGAUGUCACCGATCT	28%	1%
ND-10786	1291	GCUGCCGAGAGUGCCUUGCTCT	1292	CAAGGCACUUCUGGSCAGCTCT	15%	2%
ND-10787	1293	AGUACACACAGCAGGUGUUGCTCT	1294	CACACUUCUGUUGUUGUACUCTCT	12%	1%
ND-10788	1295	CAAGUGCCGGAAGCCAUUGCTCT	1296	GC AUGGCCUUCGCGCACUUGCTCT	94%	2%

Tabla 1C. siARN seleccionados en un conjunto sustituto de rata in vivo (siARN reactivos cruzados de humano-rata). Se identifica un grupo de detección de 48 secuencias de iARN alfa-ENaC de reacción cruzada de humano y rata. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de dosis única independientes (refiérase a la sección de ejemplos para los métodos utilizados)

Id Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Anti-sentido	1ra detección de dosis única @ 50 nM en H441; MV		2da detección @ 50 nM en H441	
					%	SD	%	SD
ND-9201	1297	uGugcAccAGAcAAUcTtT	1298	GAUUGUcUUGGUGGcAcATtT	8%	1%	8%	1%
ND-9202	1299	uuuAUGGAUGAGUGGcUuTtT	1300	AGCcAcAUcAUcUcCAUAAATtT	8%	9%	82%	6%
ND-9203	1301	CcUUuAUGGAUGAGUGGcUuTtT	1302	CACcAUcAUcUcCAUAAAGGcTtT	76%	8%	76%	2%
ND-9204	1303	CACAGcGcAUGAGAGcGcTtT	1304	CCGcUcUcAUcGcGcUUGtTtT	7%	18%	57%	3%
ND-9205	1305	AcCGcAUGAGAcGGcUuTtT	1306	AAGGcGcUcUcAUcUGGcUuTtT	3%	3%	37%	2%
ND-9206	1307	AGGAcUGGAGAcUcGcUuTtT	1308	AUGcCGAUcUcUcAGUcUcUuTtT	17%	3%	16%	3%
ND-9207	1309	GAAGcAcUGGAGAcUcGcUuTtT	1310	GCcGcAUcUcUcUcAGUcUcUuTtT	96%	18%	81%	5%
ND-9208	1311	GcAcUGGAGAcUcGcUuTtT	1312	GAAGcGcAUcUcUcAGUcUcUuTtT	58%	6%	57%	3%
ND-9209	1313	AGUuUcUcUcUcUcUcUcUuTtT	1314	CGGUAAGcGcUcUcUcUcUuTtT	8%	8%	94%	4%
ND-9210	1315	GAcUGGAGAcUcGcUuTtT	1316	GGAAcGcGcAUcUcUcAGUcUcUuTtT	79%	5%	82%	2%
ND-9211	1317	CcAUGAGAcGcGcUuTtT	1318	AGAAGcGcGcUcUcUcUcUuTtT	50%	1%	51%	1%
ND-9212	1319	GcAUGAGAcGcGcUuTtT	1320	AACcAcAGGcUcUcUcUcUuTtT	26%	3%	23%	2%
ND-9213	1321	uGcUUuAUGGAUGAGUGGcUuTtT	1322	ACcAUcUcUcUcUcUcUcUuTtT	77%	5%	76%	4%
ND-9214	1323	uccUUGcUcUcUcUcUcUcUuTtT	1324	CUUGcUcUcUcUcUcUcUcUuTtT	74%	9%	83%	6%

ND-9215	1325	AGGGAGUGGUAACcGcuuuctTs?	1326	GGAAAGGGUACcACUCCUUCts?	791	61	891	41
ND-9216	1327	GcUGUGccUAcAUcUuuctTs?	1328	AGAAAGUAGGcAcAGcCTTs?	111	11	131	11
ND-9217	1329	GAAAUuAAAGAGAGcUGTs?	1330	CGAGcUCCUUTUUAAUUCts?	841	141	781	51
ND-9218	1331	AcUGGAGAcGGcUuuccATs?	1332	UGGAAAGGcUUCcAGUts?	501	41	551	31
ND-9219	1333	CcUuuccAAccUcGcAcTs?	1334	CGUGCCcAGUUGGAcAGTs?	781	61	851	51
ND-9220	1335	CcUGcUuuuAuGGAUuGts?	1336	GAUCUcAUuAAAGcAGTs?	761	51	771	91
ND-9221	1337	AAcCGAUAGAcGGcUts?	1338	AGCCcUcUcAUAGcGcUts?	791	81	661	31
ND-9222	1339	uGccAAccUGGcAGcATs?	1340	UGCCUGCCcAGcUUGAcATs?	701	41	571	41
ND-9223	1341	GuccNccUGGcAGcATs?	1342	CUGGcUGCCcAGcUUGAcATs?	951	101	761	41
ND-9224	1343	AAAUuAAAGAGcUUGcATs?	1344	UCcAGcUCCUUTUUAAUUCts?	831	61	691	21
ND-9225	1345	GGAGGAcUGGAAAGcUGTs?	1346	CGGAUcUUCcAGcUUCts?	411	21	301	21
ND-9226	1347	GUGAGGAGUGuAcGcUts?	1348	AGGcUcAcAUCCUcUcATs?	211	11	171	01
ND-9227	1349	AcuuuAAAGAcAAAGAcATs?	1350	UCUUCUUGcUcAUUGAAcUts?	131	11	101	01
ND-9228	1351	UcAAUGAcAAAGAcAAcUts?	1352	GAGUUGUcUUGUcAUUGcATs?	361	21	281	01
ND-9229	1353	CuuuUAGcAUUGcUGcTs?	1354	GCcAcAUcAUcAAAGcTs?	241	11	201	11
ND-9230	1355	GcUUGcUGGAGAcUcUts?	1356	GGAGGcUUCcAGCCcAGcCTs?				
ND-9231	1357	UGGcUGGAGAcUcUcUts?	1358	GAUGGAGcUUCcAGCCcATs?	451	41	351	21
ND-9232	1359	GAGuuccAcGcUcUcUcUts?	1360	GGUAGGcUGGUGAAcUcUts?	891	41	861	81
ND-9233	1361	CAGAGcAGAUuGAcUuUcUts?	1362	AUGAAUGcAUUCUGcUcUts?	211	11	171	01
ND-9234	1363	UucAcUcUcUcUcUcUcUts?	1364	UCUUGAAAGcAGGAGUcATs?	851	41	741	61
ND-9235	1365	UcAcUcUcUcUcUcUcUts?	1366	CUCUUGAAAGcAGGAGUcATs?				
ND-9236	1367	CUGcUcAcAAAGAcAAUts?	1368	AUUGUcUUGGUGUcAcUts?	231	11	171	21
ND-9237	1369	CUGcAAcAAcAAcAAcUts?	1370	GAUGGUGGUGUUGcUcUts?	341	21	271	21
ND-9238	1371	UGGcUUGcUcUcUcUcUts?	1372	AGAUUGGcAcAGCCcATs?	861	41	731	101
ND-9239	1373	UGGcUUGcUcUcUcUcUts?	1374	GAGAUUGGcAcAGCCcATs?	681	61	531	41
ND-9240	1375	CUGcUcAAcUcUGGcUcUts?	1376	GGCUGCCcAGGUGGAcAGTs?	801	51	731	91
ND-9241	1377	CcUUGcUcUcUcUcUcUts?	1378	UcAcUUGGcAcAGGAGGcTs?	831	51	711	51
ND-9242	1379	GcAGcUUGGAGcUUGcUts?	1380	CACAGGcUCCcAGGcUcUts?	1051	91	901	51
ND-9243	1381	UucAAUGAcAAAGAcAAcUts?	1382	AGUUGUcUUGUcAUUGAAcTs?	231	31	211	11
ND-9244	1383	CUGcUcUcUcUcUcUcUts?	1384	CGAUcAUcAAuAAAGcAGTs?	741	61	641	71
ND-9245	1385	AAUGAcAAAGAcAAcUcUts?	1386	UGGAGUUGUcUUGUcAUUts?	211	11	211	11
ND-9246	1387	UGGcUcUcUcUcUcUcUts?	1388	AGGcUCCcAGGcUCCcATs?	831	31	731	21
ND-9247	1389	CUCUUGcUcUcUcUcUts?	1390	UGCCcAGGUGGAcAGGAGTs?	861	31	841	11
ND-9248	1391	GcUGGAGAcUcUcUcUts?	1392	UGAUUGGcUcUcUcUcUts?	921	41	881	31

5 Tabla 1D. siARN seleccionados en un conjunto sustituto de conejillo de indias in vivo (siARN de reacción cruzada de humano-conejillo de indias). Se identifica un grupo de detección de 63 secuencias de iARN alfa-ENaC de reacción cruzada de humano y conejillo de indias y se sintetizan, ambas con (cadenas de secuencia 1393-1518) y sin (cadenas de secuencia 1519-1644) modificaciones de estructura. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de dosis única independientes (refiérase a la sección de ejemplos para los métodos utilizados)

ID Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Anti-sentido	1ra detección de dosis única en H441; MV	2da detección en H441
NDB437	1393	AUcGGAcuGcuucuuAccAtsT	1394	UGGuAGAcAGUCcGAUUTsT	49%	7%
NDB438	1395	AUcGGAcuGcuuCuAccAGTsT	1396	CUcGUAGAGcAGUCcGAUUTsT	85%	5%
NDB439	1397	AAUcGGAcuGcuuCuAccTsT	1398	GGUAGAAcAGUCcGAUUTsT	36%	3%
NDB440	1399	UcGGAcuGcuuCuAccAGTsT	1400	UCUGGUAAGcAGUCcGAUUTsT	45%	3%
NDB441	1401	AccAGAAcAAUcGGAcuGcTsT	1402	CAGUCcGAUUTGUCUGGUTsT	23%	3%
NDB442	1403	CcAGAAcAAUcGGAcuGcTsT	1404	GcAGUCcGAUUTGUCUGGUTsT	50%	6%
NDB443	1405	CAGAAcAAUcGGAcuGcTsT	1406	AGcAGUCcGAUUTGUCUGGUTsT	22%	2%
NDB444	1407	CUUCcCuGcGcCuUcAcTsT	1408	GUUGAAcGGcAGcGGcAAcTsT	11%	8%
NDB445	1409	UGGuAccGcuuCuAccTsT	1410	UGUAGUGAAcGGcUAcCAcTsT	84%	7%
NDB446	1411	AUcUcGGcUcGGcCuUcTsT	1412	UGAAcGGcAGcGGcAAcTsT	90%	3%
NDB447	1413	UUCGcUcGGcCuUcAccTsT	1414	GGUUGAAcGGcAGcGGcAAcTsT	92%	2%
NDB448	1415	CAcccUcAAUcCCUAcAGTsT	1416	CCUGUAGcGAUUTGAGcGUTsT	79%	3%
NDB449	1417	AGAAcAAUcGGAcuGcuTsT	1418	AAGcAGUCcGAUUTGUCUTsT	1%	0%
					46%	5%
					93%	13%
					42%	6%
					50%	4%
					24%	6%
					39%	9%
					24%	1%
					109%	4%
					97%	13%
					121%	13%
					105%	17%
					90%	13%
					17%	3%

ND8450	1419	GAACAAUcGGAcuGcuuCTsT	1420	GAAGcAGUCcCGAUUUGUUCtsT	21%	1%	30%	5%
ND8451	1421	cGGAcuGcuuCuAaccAGAcTsT	1422	GUCUGGuAGAAcGcGUCcCGTsT	24%	2%	32%	5%
ND8452	1423	AGccuCAcAucAAccuCATsT	1424	UGAGGUUGAUUGUAGGCUTsT	51%	3%	57%	4%
ND8453	1425	GccuCAcAucAAccuCAATsT	1426	UUEAGGUUGAUUGUAGGCCTsT	16%	1%	26%	3%
ND8454	1427	GucAGccuCAcAucAAcCTsT	1428	GGUUGAUUGUAGGCUGACTsT	62%	5%	68%	6%
ND8455	1429	ucAGccuCAcAucAAccuCTsT	1430	AGGUUGAUUGUAGGCUGATsT	77%	4%	87%	6%
ND8456	1431	cAGccuCAcAucAAccuCTsT	1432	GAGGUUGAUUGUAGGCUGTsT	34%	2%	51%	8%
ND8457	1433	GGAGcuGGAccGcAucAcATsT	1434	UGUGAUcGGGUCcAGCUcCTsT	26%	2%	17%	1%
ND8458	1435	GuAccGcuuCCAcuAcAucTsT	1436	GAUGuAGUGGAAGcCGuACTsT	101%	9%	99%	11%
ND8459	1437	ccGcuuCCAcuAcAucAAcTsT	1438	GUUGAUUGuAGUGGAAGcCGTsT	85%	8%	80%	6%
ND8460	1439	cGcuuCCAcuAcAucAAcATsT	1440	UGUUGAUUGuAGUGGAAGcCGTsT	56%	6%	48%	3%
ND8461	1441	uCCAcuAcAucAAcAucCTsT	1442	GGAUUGUUGAUUGuAGUGGAATsT	77%	5%	82%	7%
ND8462	1443	uGGcAAcCuucAucuuCGcTsT	1444	GCGAAUGAUUGAUUGUcCCATsT	21%	0%	36%	6%
ND8463	1445	GcAAcuuCAucuuCGccuGTsT	1446	cAGCGGAAGAUUGAAGUUGCTsT	80%	4%	84%	13%
ND8464	1447	cAAcCuucAucuuCGccuGTsT	1448	GcAGGGAAAGAUUGAAGUUGTsT	101%	1%	102%	14%
ND8465	1449	AAcuucAucuuCGccuGccTsT	1450	GGcAGCGGAAGAUUGAAGUUTsT	100%	4%	95%	12%
ND8466	1451	AcuucAucuuCGccuGccTsT	1452	CGGcAGGGGAAGAUUGAAGUTsT	51%	4%	49%	5%
ND8467	1453	cuucAucuuCGccuGccGcTsT	1454	GCGGcAGGGGAAGAUUGAAGTsT	95%	5%	89%	4%
ND8468	1455	ucAucuuCGccuGccGcuTsT	1456	AAGCGGcAGGGGAAGAUUGATsT	91%	4%	85%	6%
ND8469	1457	cAucuuCGccuGccGcuuCTsT	1458	GAAGCGGcAGGGGAAGAUUGTsT	66%	4%	55%	4%
ND8470	1459	ucuuCGccuGccGcuuCAATsT	1460	UUGAAcGGGcAGGGGAAGATsT	97%	2%	99%	11%
ND8471	1461	cGccuGccGcuuCAAccAGTsT	1462	CUGGUUGAAcGGGcAGGGTsT	96%	4%	100%	7%
ND8472	1463	GccuGccGcuuCAAccAGGTsT	1464	CCUGGUUGAAcGGGcAGGGTsT	90%	4%	82%	5%
ND8473	1465	AuuAcuucAcuucCAccATsT	1466	UGGUUGAAcGAGAGuAAUTsT	81%	3%	72%	4%
ND8474	1467	uuAcuucAcuucCAccACTsT	1468	GUGGUUGAAcGAGAGuAAATsT	72%	2%	76%	9%

ND8475	1469	AcucAcuuccAccAcccTST	1470	GGGUGGUAAGUGAGAGUTsT	90%	3%	97%	4%
ND8476	1471	ucGcAcccucAAucccUATsT	1472	uAGGGAUUGAGGGUGcAGATsT	61%	1%	63%	3%
ND8477	1473	cuGcAcccucAAucccUAcTsT	1474	GUAGGGAUUGAGGGUGcAGTsT	74%	3%	73%	1%
ND8478	1475	uGcAcccucAAucccUAcATsT	1476	UGuAGGGAUUGAGGGUGcATsT	98%	4%	85%	1%
ND8479	1477	AcccucAAucccUAcAGGUTsT	1478	ACCTGUAGGGAUUGAGGGUTsT	55%	5%	48%	3%
ND8480	1479	ccucAAucccUAcAGGUATsT	1480	uACCUGuAGGGAUUGAGGGTsT	20%	1%	14%	1%
ND8481	1481	ccucAAucccUAcAGGUAcTsT	1482	GUACCTUGuAGGGAUUGAGGTsT	40%	2%	31%	3%
ND8482	1483	AAccAGAAcAAuccGGAcuTsT	1484	AGUCCGAUUGUUCUGGUUTsT	57%	2%	52%	0%
ND8483	1485	AAcAAuCGGAcUGcucUcTsT	1486	AGAAGcAGUCCGAUUGUUTsT	102%	5%	86%	12%
ND8484	1487	AcAAuCGGAcUGcucUcUATsT	1488	uAGAAGcAGUCCGAUUGUUTsT	40%	2%	28%	3%
ND8485	1489	CAAAuCGGAcUGcucUcUAcTsT	1490	GUAGAAGcAGUCCGAUUGUUTsT	41%	4%	38%	2%
ND8486	1491	GcAcccucAAucccUAcAGTsT	1492	CUGUAGGGAUUGAGGGUGCTsT	91%	7%	94%	4%
ND8487	1493	ccucAAcAAucccUAcAcTsT	1494	GUUGAGGUUGAUUGUAGGTsT	46%	2%	37%	3%
ND8488	1495	cucAAcAAucccUAcAcUcTsT	1496	AGUUGAGGUUGAUUGUAGGTsT	48%	2%	39%	3%
ND8489	1497	ucAAcAAucccUAcAcUcTsT	1498	GAGUUGAGGUUGAUUGUATsT	17%	1%	17%	1%
ND8490	1499	uAccGcuuccAcuAcAcUcTsT	1500	UGAUUGuAGUGGAAGCGGUATsT	90%	5%	74%	8%
ND8491	1501	AcGGcuuccAcuAcAcUcAAcTsT	1502	UUGAUUGuAGUGGAAGCGGUUTsT	103%	5%	91%	15%
ND8492	1503	GcuuccAcuAcAcUcAAcAUtsT	1504	AUGUUGAUUGuAGUGGAAGCTsT	85%	5%	71%	10%
ND8493	1505	cuuccAcuAcAcUcAAcAUcTsT	1506	GAUGUUGAUUGuAGUGGAAGTsT	60%	5%	45%	3%
ND8494	1507	uccAcuAcAcUcAAcAUccUtsT	1508	AGGAUGUUGAUUGuAGUGGATsT	33%	3%	41%	3%
ND8495	1509	ccAcuAcAcUcAAcAUccUcTsT	1510	cAGGAUGUUGAUUGuAGUGGTsT	60%	5%	55%	2%
ND8496	1511	cuGGcAAcucAAcUcUcUcTsT	1512	CGAAUGuAGUUGCCcAGTsT	18%	0%	20%	0%
ND8497	1513	GGcAAcucAAcUcUcUcUcTsT	1514	AGCCGAAGAUUGuAGUUGCCTsT	76%	1%	77%	2%
ND8498	1515	uucAAcucUcUcUcUcUcUcTsT	1516	AGCCGcAGGCGGAAGUAAcTsT	65%	4%	74%	12%
ND8499	1517	ucGccuGccGcuucAAcAcTsT	1518	UGGUUGuAGGCGGcAGGCGATsT	86%	5%	77%	3%

ND-8653	1519	AAUCGGACUGCUUCUACCATsT	1520	UGGUAGAAGCAGUCCGAUUUsT	16%	2%	20%	3%
ND-8654	1521	AUCGGACUGCUUCUACCATsT	1522	CUGGUAGAAGCAGUCCGAUUsT	54%	8%	67%	11%
ND-8655	1523	AAAUCCGACUGCUUCUACCTsT	1524	GGUAGAAGCAGUCCGAUUUsT	25%	4%	28%	2%
ND-8656	1525	UCGGACUGCUUCUACCATsT	1526	UCUGGUAGAAGCAGUCCGATsT	12%	2%	17%	1%
ND-8657	1527	ACCAGAACAAUCCGACUGTsT	1528	CAGUCCGAAUUGUUGUGUsT	33%	3%	35%	1%
ND-8658	1529	CCAGAACAAUCCGACUGTsT	1530	GCAGUCCGAAUUGUUGUGUsT	27%	3%	30%	2%
ND-8659	1531	CAGAACAAUCCGACUGTsT	1532	AGCAGUCGAAUUGUUGUGUsT	15%	1%	22%	3%
ND-8660	1533	CUUCGOCUGCCGCUUCAACTsT	1534	GUUGAAGCGGCAGCGGAAGTsT	69%	17%	75%	10%
ND-8661	1535	UGGUACCGCUUCACUACATsT	1536	UGUAGUGGAAGCGGUACCATsT	16%	2%	20%	3%
ND-8662	1537	AUCUUCGOCUGCCGCUUCATsT	1538	UGAAGCGGCAGCGGAAGAUUsT	19%	2%	25%	4%
ND-8663	1539	UUCCGCUCCGCUUCAACTsT	1540	GGUUGAAGCGGCAGCGGAATsT	90%	4%	97%	10%
ND-8664	1541	CACCCUCAAUCCCUACAGTsT	1542	CCUGUAGGGAUUGAGGGUGTsT	19%	2%	25%	3%
ND-8665	1543	AGAACAAAUCCGACUGCUUsT	1544	AAGCAGUCCGAAUUGUUCUsT	13%	1%	22%	2%
ND-8666	1545	GAACAAUCCGACUGCUUCUsT	1546	GAAGCAGUCCGAAUUGUUCUsT	11%	2%	18%	2%
ND-8667	1547	CGGACUGCUUCUACCATsT	1548	GUCUGGUAGAAGCAGUCCGTsT	13%	1%	16%	2%
ND-8668	1549	AGCCUCAAACAUCAACCUUGATsT	1550	UGAGGUUGAAUUGAGGGCUUsT	17%	4%	21%	3%
ND-8669	1551	GCCUCAAACAUCAACCUCAATsT	1552	UUAGGUUGAAUUGAGGGCUUsT	13%	1%	21%	3%
ND-8670	1553	GUCAGCCUCAAACAUCAACCTsT	1554	GGUUGAAUUGAGGGCUUGATsT	43%	11%	27%	3%
ND-8671	1555	UCAGCCUCAAACAUCAACCUUsT	1556	AGGUUGAAUUGAGGGCUUGATsT	90%	17%	53%	13%
ND-8672	1557	CAGCCUCAAACAUCAACCUUsT	1558	GAGGUUGAAUUGAGGGCUUGATsT	17%	3%	11%	3%
ND-8673	1559	GGAGCUGGACCGCAUACATsT	1560	UGUAGUGGGUCCAGCUCCUsT	25%	3%	18%	3%
ND-8674	1561	GUACCGCUUCUCCAUACUUsT	1562	GAUGUAGUGGAAGCGGUACTsT	21%	4%	16%	4%
ND-8675	1563	CCGCUCCCAUACAUCAACTsT	1564	GUUGAAUUGAGGAAAGCGTsT	25%	4%	19%	3%
ND-8676	1565	CGCUUCCAUACAUCAACTsT	1566	UGUUGAAUUGAGGAAAGCGTsT	16%	3%	14%	1%
ND-8677	1567	UUCCAUCAAACAUCAACCUUsT	1568	GGAAUUGAAUUGAGGAAATsT	110%	19%	97%	9%

ND-8678	1569	UGGCAACUUCUUCUUCGCTsT	1570	GCGAAGAUGAAGUUGCCCATsT	50%	8%	48%	5%
ND-8679	1571	GCAACUUCUUCUUCGCGCTsT	1572	CAGCGAAGAUAGAAGUUGCTsT	19%	3%	17%	2%
ND-8680	1573	CAACUUCAUUCUUGCCUUGCTsT	1574	GCAGGCGAAGAUAGAAGUUGTsT	25%	2%	23%	2%
ND-8681	1575	AACUUCUUCUUCGCGUUGCTsT	1576	GGCAGCGAAGAUAGAAGUUGTsT	104%	7%	85%	10%
ND-8682	1577	ACUUCUUCUUCGCGUUGCGTsT	1578	CGGCAGGCGAAGAUAGAAGUUGTsT	91%	8%	63%	9%
ND-8683	1579	CUUCUUCUUCGCGUUGCGCTsT	1580	GCGCAGGCGAAGAUAGAAGTsT	88%	6%	58%	6%
ND-8684	1581	UCAUCUUCGCGUUGCGUUTsT	1582	AAGCGCAGCGAAGAUAGATsT	76%	3%	64%	4%
ND-8685	1583	CAUCUUCGCGUUGCGUUCTsT	1584	GAAGCGCAGCGAAGAUAGTsT	15%	1%	18%	3%
ND-8686	1585	UCUUCGCGUUGCGUUCATsT	1586	UUGAAGCGCAGCGAAGATsT	109%	22%	31%	3%
ND-8687	1587	CGCCUUGCGUUCACCAGTsT	1588	CUGGUUGAAGCGGAGGCGTsT	90%	21%	49%	2%
ND-8688	1589	GCCUGCGUUCACCAGGTsT	1590	CCUGGUUGAAGCGGCGGCTsT	43%	9%	24%	7%
ND-8689	1591	AUACUCUCACUUCACCATsT	1592	UGGUGAAGUUGAGAGUAUTsT	27%	4%	19%	2%
ND-8690	1593	UUACUCUCACUUCACCCTsT	1594	GUGUGAAGUUGAGAGUAATsT	109%	7%	85%	8%
ND-8691	1595	ACUCUCACUUCACCACCTsT	1596	GGUGUGAAGUUGAGAGUTsT	93%	11%	87%	12%
ND-8692	1597	UCUGCACCCUCAAUCCUATsT	1598	UAGGGAUUGAGGUGCAGATsT	31%	12%	17%	2%
ND-8693	1599	CUGCACCCUCAAUCCUACTsT	1600	GUAGGGAUUGAGGUGCAGTsT	41%	25%	31%	4%
ND-8694	1601	UGCACCCUCAAUCCUACATsT	1602	UGUAGGGAUUGAGGUGCATsT	75%	25%	43%	3%
ND-8695	1603	ACCUCAAUCCUACAGGUTsT	1604	ACCUGUAGGGAUUGAGGGUTsT	65%	26%	25%	5%
ND-8696	1605	CCUCAAUCCUACAGGUATsT	1606	UACCUUGAAGGGAUUGAGGGTsT	18%	2%	13%	1%
ND-8697	1607	CCUCAUCCUACAGGUACTsT	1608	GUACCUUGAAGGGAUUGAGGGTsT	16%	4%	13%	2%
ND-8698	1609	ARCCAGAACAAUCCGACUTsT	1610	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUTsT	40%	2%	30%	2%
ND-8699	1611	AACAAUCCGACUUCUUTsT	1612	AGAAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	56%	4%	45%	3%
ND-8700	1613	ACAAUCCGACUUCUUAATsT	1614	UAGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	18%	3%	12%	1%
ND-8701	1615	CAAAUCCGACUUCUUAATsT	1616	GUAGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	15%	2%	15%	4%
ND-8702	1617	GCACCCUCAAUCCUACAGTsT	1618	CUGUAGGGAUUGAGGGUGCTsT	53%	4%	46%	20%

ND-8703	1619	CCUCAAACAUAACCCUCAAACCTsT	1620	GUUGAGGUUGAUGUUGAGGTTsT	25%	6%	26%	9%
ND-8704	1621	CUCAAACAUAACCCUCAAACUTsT	1622	AGUUAGGUUGAUGUUGAGTTsT	30%	8%	37%	26%
ND-8705	1623	UCAACAUAACCCUCAAACUCTsT	1624	GAGUUGAGGUUGAUGUUGATsT	55%	1%	50%	10%
ND-8706	1625	UACCGCUUCCACUACAUCATsT	1626	UGAUGUAGUGGAAGCGGUATsT	36%	7%	31%	7%
ND-8707	1627	ACCGCUUCCACUACAUCATsT	1628	UUGAUGUAGUGGAAGCGGUTsT	23%	5%	27%	10%
ND-8708	1629	GCUUCCACUACAUCAACAUTsT	1630	AUGUUGAUGUAGUGGAAGCTsT	16%	4%	24%	12%
ND-8709	1631	CUUCCACUACAUCAACAUTsT	1632	GAUGUUGAUGUAGUGGAAGTTsT	62%	3%	74%	27%
ND-8710	1633	UCCACUACAUCAACAUCCUTsT	1634	AGGAUGUUGAUGUAGUGGATsT	45%	8%	41%	1%
ND-8711	1635	CCACUACAUCAACAUCCUGTsT	1636	CAGGAUGUUGAUGUAGUGGTTsT	23%	4%	27%	10%
ND-8712	1637	CUGGCAACUUCUUCUUGTsT	1638	CGAAGAUGAAGUUGCCAGTTsT	34%	4%	26%	5%
ND-8713	1639	GGCAACUUCUUCUUCUUGTsT	1640	AGCCGAAGAUGAAGUUGCCCTsT	30%	3%	23%	2%
ND-8714	1641	UUCAUUCUUGCCUUGCCGUTsT	1642	AGCGGCAGCCGAAGAUGAATsT	90%	14%	85%	14%
ND-8715	1643	UCGCCUGCCGCUUCAACCATsT	1644	UGGUUGAAGCGGCAGCCGATsT	23%	2%	20%	4%

ES 2 432 532 T3

Tabla 2A: Concentración en 50 % de inhibición (IC50) para agentes de iARN de ejemplo de la Tabla 1A

	IC50 [nM] 1er DRC en	IC50 [nM] 2do DRC en
ID Dúplex	H441	H441
ND8294	0.1949	0.0468
ND8295	0.1011	0.0458
ND8299	0.5986	0.5638
ND8302	0.0144	0.0134
ND8313	0.0315	0.0124
ND8320	0.0796	0.0078
ND8331	0.0213	0.0158
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

ES 2 432 532 T3

(continuación)

ID Dúplex	IC50 [nM]	IC50 [nM]
	1er DRC en	2do DRC en
ND8392	0.3831	0.4775
ND8396	0.0023	0.0052
ND8403	0.0808	0.0759

Tabla 2B: Concentración a 50 % de inhibición (IC50) y para agentes de iARN de ejemplo de la Tabla 1D

ID Dúplex	IC50	IC50
	[nM]	[nM]
	1er DRC en H441	2do DRC en 441
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

5 Tabla 2C: % de actividad del ARNi de ejemplo hacia la inhibición de la expresión génica de alfa-ENaC en los ensayos descritos en el Ejemplo 3

Identificador Dúplex	% de expresión de alfa-ENaC en HBEC primario (% de control) 50nM siARN	Expresión alfa-EnaC de Macaco de java (% de control) 45nM siARN
No transfectado	77.2	n/a
No dirigido	100	93.3
Control		
Control Negativo (alfa-ENaC No cino) ND8449	n/a	100
ND-8302	30.2	57

ES 2 432 532 T3

(continuación)

Identificador Dúplex	% de expresión de alfa-ENaC en HBEC primario (% de control) 50nM siARN	Expresión alfa-EnaC de Macaco de java (% de control) 45nM siARN
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 de iARN que comprende una cadena sentido y una cadena anti-sentido, en donde:
- 5 a. la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8496 (SEQ ID NO: 1511), y la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de ND8496 (SEQ ID NO: 1512); o
- b. la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8712 (SEQ ID NO: 1637), y la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de ND8712 (SEQ ID NO: 1638).
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena anti-sentido tiene 30 o menos nucleótidos de longitud, y en donde la cadena sentido y la cadena anti-sentido forman una región dúplex de 15 a 30 pares de nucleótidos de longitud.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena anti-sentido y la cadena sentido tienen cada uno 19 a 23 nucleótidos de longitud.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende una modificación que provoca que el agente iARN tiene aumento de la estabilidad en una muestra biológica.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende un fosforotioato o un nucleótido modificado 2'.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende:
- por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido modificado 2'; por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado 2'; por lo menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado 2'; o por lo menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado 2'.
- 25 7. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende una modificación 2' seleccionada del grupo que consiste de: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).
8. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende un extremo romo.
- 30 9. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende un nucleótido saliente que tiene 1 a 4 nucleótidos no apareados.
10. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN comprende un nucleótido saliente en el extremo 3' de la cadena anti-sentido del agente iARN.
11. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN es ND8496 (SEQ ID NOs: 1511 y 1512).
- 35 12. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN es ND8712 (SEQ ID NOs: 1637 y 1638).
13. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente iARN se liga a uno o más de compuesto diagnóstico, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, unidad estructural que confiere resistencia a nucleasa, nucleobase natural o inusual, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado con epifriedelanol, vitamina, carbohidrato, dextrano, pululan, chitina, chitosan, carbohidrato sintético, Oligo Lactato 15-mer, polímero natural, polímero de bajo o de medio peso molecular, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de unión a proteína, molécula que dirige integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitador de péptido, y/o transferrina.
- 40 14. Una composición que comprende un agente de iARN a alfa-ENaC, en donde el agente iARN comprende una cadena sentido y una cadena anti-sentido, en donde la cadena sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de un agente de iARN seleccionado del grupo que consiste de ND8496 (SEQ ID NO:
- 45

1511) y ND8712 (SEQ ID NO: 1637), y en donde la cadena anti-sentido comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena anti-sentido de un agente de iARN seleccionado del grupo que consiste de ND8496 (SEQ ID NO: 1512) y ND8712 (SEQ ID NO: 1638), la composición comprende adicionalmente un ligando de receptor epitelial.

5 15. La composición de la reivindicación 14, en donde el ligando de receptor epitelial es (i) transferrina o (ii) ácido fólico.

16. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 14 para uso en terapia.

10 17. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 14 para uso en tratar una enfermedad mediada por disfunción del canal de sodio epitelial seleccionado de: fibrosis quística, disquinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, infecciones del tubo respiratorio, carcinoma de pulmón, síndrome de Liddles, hipertensión, insuficiencia renal, y desequilibrio de electrolitos.

Figura 1:

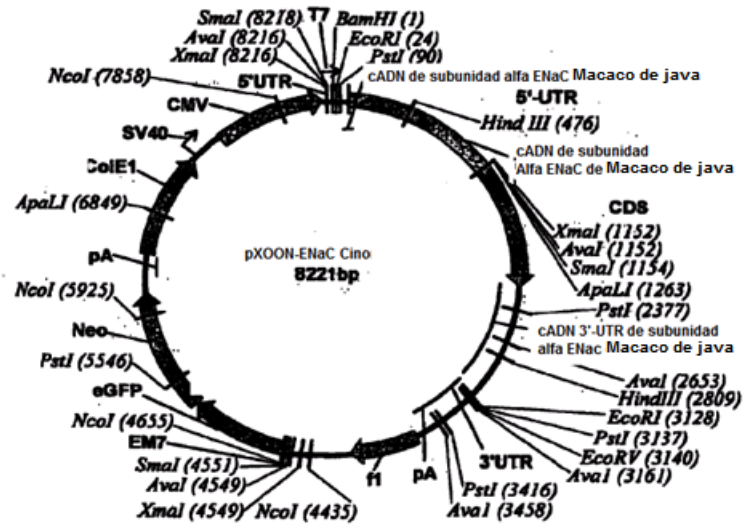


Figura 2

SEQ.I.D.NO:1682

GAATTCGCCCTTGGCCGCTGCACCTGTAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGA
 CCCTAGACCTCTGCAGCCACCGCAGGGCTCATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCA
 GGACGCTAGCCCTCCACAGCCCACCCAGGGCTCATGAAGGGGGACAAGCGTGAGGA
 GCAGGGGCTGGGCCAGAACCTGCGGCACCCACAGCAGCCACGGCGGAGGAGGAGGC
 CCTGATCGAGTTCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAGTTCCTTCGCAACAATAC
 CACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCAGCACAACCGCATGAAGACGGC
 CTTCGAGGAGTGTCTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTCGGCT
 GCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCGGA
 CAAGCTTGTCTTCCCGCAGTGACCATCTGCACCCCTCAATCCCTACAGGTATCCGGA
 AATTAAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACACAGCAGACGCTCTTTGACCT
 GTACAAATACGACTCCTCCCCACCCCTCGTGGCCGGCTCCCGCGGCCGTCGTGACCT
 GCGGGCACTCTGCCGCACCTCTTGCAGCGCTGAGGGTCCCGTCCCGCTTCACGG
 GSCCGTCAAGCCCGTAGCGTGGCTCCAGCGTCCGGGACAACAACCCCAAGTGA
 CTGGAAGGACTGGAAGATCGGTTTCGAGCTGTGAACCAGAACAATCAGACTGCTT
 CTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCAGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTA
 CATCAACATCCTGTGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACACT
 GGGCAACTTCATCTTCGCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCTGCAACCAGGCGAATTA
 CTCTCACTTCCACCACCCAATGTATGGAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACA
 CTCTAACCTCTGGATGCTTCCATGCCCTGGAGTCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCT
 GCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGGT
 AATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCCTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGG
 GCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAGCCCTGGACAGACTTGGGG
 CGACTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTCCCTGTCAAGAACCTTTACCC
 TTCAAAGTACACGCAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAACATGATCAA
 GGAGTGTGGCTGTGCTTACATCTTCTATCCCGCGCCGAGAACATGGAGTACTGTGA
 CTACAGGAAGCACAGTTCTGGGGCTACTGCTACTATAAGCTCCAGGCTGACTTCTC
 CTCAGACCACCTGGGCTGTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGTGTGACCAGCTA
 CCAGCTCTCGGCTGGTFACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTT
 CGAGATGCTATCGCGACAGAACAACCTACACCATCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGC
 CAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTTGAGTCTCCCTC
 TGTCACGATGGTCACCCCTCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGG
 CTCTCAGTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCATCTTTGACCTGCTGGTCAT
 CACATTCCTCCTGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGG
 GGACAGGGGTGCTCAGGAGGTGGCTCCACCCAGGCATCCTCCCCGCTTCCACTT

CTGCCCCACCCACATCTCTGTACTTGTCCCAACTAGGCCCTGCTCCCTCCCCAGC
 CTTGACAGCCCTCCCTTGCCTATGCCACCCTGGGCCCTGCCCATCTCCAGGGG
 CTCCGCAGGGGCCAGCTCCACTGCCTATCCTCTGGGGGGCCCTGAGAGAGGAGAG
 TTCCTTGCACCAAGGCAGATGCTCCCTGGTGGGAGGGTGTGCCCTTGGAAGAT
 GAAGGATGTGCAGGGCTTCTCTCAGAGCCGCCAAACTGCCCTTGATGTGTGGAG
 GGAAGCGAGATGGGTAAGGGGCTCAGGAAGTTGTTCCAAGAACAGTGGCCAATGAAG
 CTGCCAGAAAGTGCCTTGGCTCTGGCTCTGTACCCCTTGGTACTGCCTCTGAACACT
 CTGGTTTCCCCACCAACTGCAGCTAAGTCTCCTTTTCCCTTGGATCAGCCAAGCCA
 AACTTGGAGCTTTGACAAGGAACTTTCCTAAGAAATGGCTGATGACCAGGACAAAAC
 ACAACCAAGGGTACACACAGGCATGCACGCGTTTCTGCCTGGCGACAGGTGAAGCC
 AGCCCTGACTGACCTGGCCACACTGCTCTCCAGTAACACAGATGTCTGCCCTCAT
 CTGAACTTGGGTGGGAAACCCCAACCAAAAGCCCTTTATTACTTAGGCAATTC
 CCTTCCCTGACTCCCAGAGCCAGGGCCAGAGCAGACCCGTATAAGTAAAGGCAGCT
 CCAGGGCTCCTCTAGGCTCATACCCGTGCCCTCACAGAGCCATGCTCCAGCGCTCT
 GTCTGTGTCTTTCGTCCTCTACATGTCTGCTCAAGACATTTTCTCAGCCTGAAAG
 CTCCCCAGCCATCTGCCGGAGAACTCCTATGCATCCCTCAGAACCCTGCTCAGACA
 CCATTACTTTTGTGAAGGCTTCTGCCACATCTTGTGTCGCCAAAAATGATCACTCC
 CCTTCTGGTGGGCTCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTGCTGTTGCA
 CCATACTTCTTGTACGTTTGTGCTGCTGCCCAACTGGACTGTGAGGGCCTTGTG
 GCCAGGGACTGAGTCTTGCCTGTTATGTATGCTCCGTGCTAGCCCATCATCCTGC
 TTGAAGCAAGTAGGCAGATGCTCAAAAGGGCGAATTCCTGCAGATATC

Traducción:

SEQ. I. D. NO: 1681

MEGNKLEEQDASPPQPTPGLMKGDKREEQGLGPEPAAPOQPTAEEEEALIEFH
 RSYRELFEFFCENNTIHGAI RLVC SQHNRMKTAFWAVLWLC TFGMMYWQFGLLFGEY
 FSYPVSLNINLNSDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITQQTLFDLYKYDS
 SPTLVAGSRGRDLRGTLPHELLQRLRVPSPLHGARQARSVASSVRDNNPQVDWKDWK
 IGFELCNQKSDCFYQTYSSGVDAREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIF
 ACRFNQVSCNQANYSHFHPMYGNCYTFNDKNSNLWMSMPGVNNGLSLMLRTEQN
 DFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPAFMDDGGFNLRPGVETSI SMRKEALDRLGGDYGDC
 TKNGSDVPVKNLYPSKYTQQVCIHSCFQENMIKEGCAYIFYPRPQNMEYCDYRKHS
 SWGYCYKQLQADFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFEMLSR
 QNNYTINNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSPESVMTMVTLLSNLGSQWLSLWFGSSVLS
 VVEMAE LIFDLLVITFLLLLRRFRSRYWSPGRGDRGAQEVASTQASSPPSHFCPHPT
 SLYLSQLGPAPSPALTAPPPAYATLGPCSPGGGASSTAYPLGGP

Figura 3

