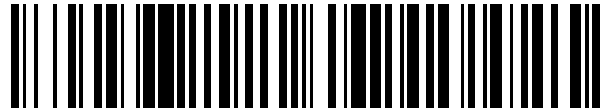


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 643**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 10163496 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2224004**

54 Título: **Inhibición de la expresión de la alfa-ENaC por medio de ARNi**

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 2 432 643 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 la expresión de la alfa-ENaC por medio de ARNi

## 5 Campo técnico

La invención se refiere al campo del transporte iónico a través de las vías respiratorias mediado por ENaC, y a las composiciones y métodos para modular la expresión de alfa-ENaC, y más particularmente, con la subregulación de alfa-ENaC mediante oligonucleótidos por medio de la interferencia del ARN, que se administran localmente a los pulmones y al pasaje nasal por medio de administración por inhalación/intranasal, o se administran en forma sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.

Antecedentes

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

Las superficies mucosas en la interfase entre el medio ambiente y el cuerpo, han desarrollado una cantidad de mecanismos de protección. Una forma principal de tal defensa innata, es limpiar estas superficies con líquido. Típicamente, la cantidad de la capa de líquido sobre una superficie mucosa refleja el equilibrio entre la secreción líquida epitelial, que refleja con frecuencia la secreción de aniones ( $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{HCO}_3^-$ ) acoplada con agua (y un contra-ión catiónico), y la absorción del líquido epitelial, que con frecuencia refleja la absorción de  $\text{Na}^+$ , acoplada con agua y un contra-anión ( $\text{Cl}^-$  y/o  $\text{HCO}_3^-$ ). Muchas enfermedades de las superficies mucosas son causadas por tener muy poco líquido protector sobre estas superficies mucosas, creado por un desequilibrio entre la secreción (muy poca) y la absorción (relativamente alta). Los procesos defectuosos de transporte de sales que caracterizan estas disfunciones de las mucosas residen en la capa epitelial de la superficie mucosa. Un enfoque para reponer la capa protectora de líquido sobre las superficies mucosas es "reequilibrar" el sistema, por medio el bloqueo de la absorción de líquido mediada por el canal de  $\text{Na}^+$ . La proteína epitelial que media la etapa limitante de la velocidad de la absorción de  $\text{Na}^+$  y de líquido es el canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENaC). El alfa-ENaC se coloca sobre la superficie apical del epitelio, es decir, la interfase entre el medio ambiente y la superficie mucosa. La inhibición de la absorción de líquido mediada por  $\text{Na}^+$  mediada por alfa-ENaC puede tener utilidad terapéutica. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar terapias efectivas para el tratamiento y la prevención de enfermedades o de trastornos en donde esté implicado la alfa-ENaC, por ejemplo, fibrosis quística en seres humanos y animales, y en particular para terapias con una alta eficiencia. Un requisito previo para una alta eficiencia es que el ingrediente activo no se degrade muy rápidamente en un medio ambiente fisiológico.

Li Tianbo y colaboradores, describe como la interferencia del ARN de alfa-ENaC inhibe la absorción de fluido en el pulmón de rata *in vivo*, Am Journal of Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L649 - L660, 2006.

Resumen

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

a. la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8453 (SEQ m NO: 1425), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de ND8453 (SEQ m NO: 1426), o

b. la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8489 (SEQ m NO: 1497), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de ND8489 (SEQ m NO: 1498); o

c. la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8456 (SEQ ID NO: 1431), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos de la cadena antisentido de ND8456 (SEQ ID NO: 1432).

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

5 en donde la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8453 (SEQ ID NO: 1425), ND8489 (SEQ m NO: 1497), y ND8456 (SEQ ID NO: 1431), y

en donde la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8453 (SEQ ID NO: 1426); ND8489 (SEQ ID NO: 1498), y ND8456 (SEQ m NO: 1432),

la composición comprende además un ligando receptor helicoidal.

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

Las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones del agente de ARNi pueden ser usadas con cualquier dosis y/o formulación descrita en la presente invención invención, así como con cualquier ruta de administración descrita en la presente invención invención.

15 Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la descripción más adelante. Otras características, objetivos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de esta descripción, de los dibujos, y de las reivindicaciones.

En las Figuras:

Figura 1: Mapa de digestión de restricción de la construcción pXcon para  $\alpha$ -EnaC del cinomólogo clonado.

20 Figura 2: Secuencia de ADN y de la proteína de alfa-ENaC de mono cinomólogo.

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

Descripción detallada

25 Para mayor facilidad de exposición, el término "nucleótido" o "ribonucleótido" se utiliza algunas veces en la presente invención invención con referencia a una o más subunidades monoméricas de un agente de ARN. Se entenderá que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido" en la presente invención invención puede, en el caso de un ARN modificado o de un sustituto de nucleótido, referirse también a un nucleótido modificado, una fracción de reemplazo sustituta, como se describe adicionalmente más adelante, en una o más posiciones.

30 Un "agente de ARN", como se utiliza en la presente invención invención, es un ARN no modificado, un ARN modificado, o un sustituto de nucleósido, cada uno de los cuales se describe en la presente invención invención o es bien conocido en la técnica de síntesis de ARN. Aunque se describen numerosos ARN modificados y sustitutos de nucleósidos, los ejemplos preferidos incluyen aquéllos que tienen una mayor resistencia a la degradación de la nucleasa que los ARN no modificados. Los ejemplos preferidos incluyen aquéllos que tienen una modificación del azúcar 2', una modificación en una saliente monocatenaria, preferiblemente una saliente monocatenaria 3', o, particularmente si la cadena monocatenaria es una modificación 5' que incluye uno o más grupos fosfato, o uno o más análogos de un grupo fosfato.

40 Un "agente de ARNi" (abreviatura para "agente de ARN de interferencia"), como se utiliza en la presente invención invención, es un agente de ARN que puede subregular la expresión de un gen objetivo, por ejemplo un gen SCNN1A para ENaC. Aunque sin ánimo de ceñirnos a ninguna teoría en particular, un agente de ARNi puede actuar mediante uno o más de una cantidad de mecanismos, incluyendo escisión posterior a la transcripción de un ARNm objetivo algunas veces denominado en la técnica como ARNi, o mecanismos previos a la transcripción o previos a la traducción.

45 Un "agente de ARNi bc" (abreviatura para "agente de ARNi bicatenario"), como se utiliza en la presente invención invención, es un agente de ARNi que incluye más de una, y preferiblemente dos cadenas, en donde la hibridación entre cadenas puede formar una región de estructura dúplex. Una "cadena" se refiere en la presente invención a una secuencia contigua de nucleótidos (incluyendo nucleótidos que no se presenten naturalmente o modificados). Las dos o más cadenas pueden ser, o cada una puede formar parte de moléculas separadas, o se pueden interconectar

- de una manera covalente, por ejemplo mediante un enlazador, por ejemplo un enlazador de polietilenglicol, para formar una molécula. Al menos una cadena puede incluir una región que sea suficientemente complementaria con un ARN objetivo. Tal cadena se denomina como la "cadena antisentido". Una segunda cadena del agente de ARNbc, que comprende una región complementaria con la cadena antisentido, se denomina la "cadena sentido". Sin embargo, también se puede formar un agente de ARNi bc a partir de una sola molécula de ARN que sea al menos parcialmente auto-complementaria, formando, por ejemplo, una estructura de horquilla o de manija, incluyendo una región dúplex. Éstas últimas se denominan en la presente invención como los ARN cortos de horquilla o ARNsh. En este caso, el término "cadena" se refiere a una de las regiones de la molécula de ARN que es complementaria a la otra región de la misma molécula de ARN.
- 10 Aunque, en células de mamífero, los agentes de ARNi bc largos pueden inducir la respuesta de interferón, que con frecuencia es nociva, los agentes de ARNi bc cortos no desencadenan la respuesta del interferón, al menos no hasta un grado en que sea perjudicial para la célula y/o para el huésped (Manche y colaboradores, Mol. Cell. Biol. 12: 5238, 1992; Lee y colaboradores, Virology 199: 491, 1994; Castelli y colaboradores, J. Exp. Med. 186: 967, 1997; Zheng y colaboradores, RNA 10: 1934, 2004; HeideI y colaboradores, Nature Biotechnol. 22 1579). Los agentes de ARNi de la presente invención incluyen moléculas que son suficientemente cortas para no desencadenar una respuesta de interferón no específica nociva en células de mamífero normales. Por consiguiente, la administración de una composición que incluya un agente de ARNi (por ejemplo, formulada como se describe en la presente invención) a un sujeto, se puede utilizar para disminuir la expresión del alfa-ENaC en el sujeto, mientras que evita una respuesta del interferón. Las moléculas que son suficientemente cortas para no desencadenar una respuesta del interferón nocivo, se denominan como agentes de ARNi corto o los ARNi corto en la presente invención. "Agente de ARNi corto" o "ARNi corto", como se utiliza en la presente invención, se refiere a un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi bc, que es suficientemente corto para no inducir una respuesta de interferón perjudicial en una célula de mamífero, y en particular de un ser humano, por ejemplo, tiene una región dúplex de menos de 60, pero preferiblemente de menos de 50, 40, o 30 pares de nucleótidos.
- 25 Los agentes de ARNi aislados descritos en la presente invención, incluyendo los agentes de ARNi bc y los agentes de ARNi corto, pueden mediar la expresión disminuida de alfa-ENaC, por ejemplo, mediante la degradación del ARN. Por conveniencia, este ARN también se denomina en la presente invención como el ARN que se va a silenciar. Este ácido nucleico también se denomina como un "ARN objetivo", algunas veces "molécula de ARN objetivo", o algunas veces "gen objetivo".
- 30 Como se utiliza en la presente invención, la frase "ARNi media", se refiere a la capacidad de un agente para silenciar, de una manera específica para la secuencia, un gen objetivo. "Silenciamiento de un gen objetivo" significa el proceso mediante el cual una célula que contiene y/o que expresa cierto producto del gen objetivo cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o expresará al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, o el 90% menos de ese producto genético cuando se pone en contacto con el agente, en comparación con una célula similar que no se haya puesto en contacto con el agente. Tal producto del gen objetivo, por ejemplo, puede ser un ARN mensajero (ARNm), una proteína, o un elemento regulador.
- 35 Como se utiliza en la presente invención, el término "complementario" se utiliza para indicar un grado suficiente de complementariedad, de tal manera que se presenta un enlace estable y específico entre un compuesto y una molécula de ARN objetivo, por ejemplo ARNm para alfa-ENaC. El enlace específico requiere de un grado suficiente de complementariedad para evitar el enlace no específico del compuesto oligomérico con las secuencias no objetivo bajo condiciones en donde se desea el enlace específico, es decir, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos *in vivo* o del tratamiento terapéutico, o en el caso de los ensayos *in vitro*, bajo condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Las secuencias no objetivo típicamente difieren de las secuencias objetivo en al menos 2, 3, o 4 nucleótidos.
- 40 Como se utiliza en la presente invención, un agente de ARNi es "suficientemente complementario" con un ARN objetivo, por ejemplo, un ARNm objetivo (por ejemplo, ARNm para alfa-ENaC), si el agente de ARNi reduce la producción de una proteína codificada por el ARN objetivo en una célula. El agente de ARNi también puede ser "exactamente complementario" con el ARN objetivo, por ejemplo, el ARN objetivo y el agente de ARNi se hibridan, preferiblemente para formar un híbrido hecho exclusivamente de pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un agente de ARNi "suficientemente complementario" puede incluir una región interna (por ejemplo, de al menos 10 nucleótidos), que sea exactamente complementaria con un ARN para alfa-ENaC objetivo. Más aún, en algunas formas de realización, el agente de ARNi discrimina específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el agente de ARNi solamente media el ARNi si se encuentra una complementariedad exacta en la región (por ejemplo, dentro de 7 nucleótidos) la diferencia de un solo nucleótido.
- 45 Los agentes de ARN preferidos se basarán en, o consistirán en, o comprenderán, las secuencias sentido y antisentido proporcionadas en las Tablas 1A - 1D.

Como se utiliza en la presente invención, "esencialmente idéntica", cuando se utiliza para referirse a una primera secuencia de nucleótidos en comparación con una segunda secuencia de nucleótidos, significa que la primera

5 secuencia de nucleótidos es idéntica a la segunda secuencia de nucleótidos, excepto por hasta una, dos, o tres sustituciones de nucleótidos (por ejemplo, adenosina reemplazada por uracilo). "Que retiene esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas", como se utiliza en la presente invención para referirse a un agente de ARNi no idéntico a, pero derivado de, uno de los agentes de ARNi de las Tablas 1A - 1D, mediante supresión, adición, o sustitución de nucleótidos, significa que el agente de ARNi derivado posee una actividad inhibitoria no menor del 20% de la actividad inhibitoria del agente de ARNi de las Tablas 1A - 1D de donde se derivó. Por ejemplo, un agente de ARNi derivado a partir de un agente de ARNi de las Tablas 1A - 1D, que disminuye la cantidad del ARNm para alfa-ENaC presente en las células humanas cultivadas en un 70%, puede por sí mismo disminuir la cantidad de ARNm presente en células humanas cultivadas en al menos un 50%, para que se considere como esencialmente retenedor de la capacidad para inhibir la replicación del alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Opcionalmente, un agente de ARNi puede disminuir la cantidad del ARNm para alfa-ENaC presente en las células humanas cultivadas, en al menos un 50%.

15 Como se utiliza en la presente invención, un "sujeto" se refiere a un organismo de mamífero que experimenta el tratamiento para 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 forma de realización preferida, el sujeto es un humano.

#### Diseño y selección de agentes de ARNi

20 Como se utiliza en la presente invención, "trastornos asociados con la expresión de alfa-ENaC" se refiere a cualquier estado biológico o patológico que (1) es mediado al menos en parte por la presencia de alfa-ENaC, y (2) cuyo resultado pueda ser afectado por la reducción del nivel de alfa-ENaC presente. Los trastornos específicos asociados con la expresión de alfa-ENaC se mencionan más adelante.

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

25 Un agente de ARNi puede ser diseñado racionalmente con base en la información de secuencia y en las características deseadas. Por ejemplo, un agente de ARNi se puede diseñar de acuerdo con la temperatura de fusión relativa del dúplex candidato. En términos generales, el dúplex debe tener una temperatura de fusión más baja en el extremo 5' de la cadena antisentido que en el extremo 3' de la cadena antisentido.

La presente divulgación proporciona composiciones que contienen ARNi corto(s) y/o shARN(s) dirigidos hacia una o más transcripciones de alfa-ENaC.

30 Para cualquier objetivo genético particular que se seleccione, el diseño de los ARNi corto o los shARN para uso de acuerdo con la presente divulgación preferiblemente seguirá ciertos lineamientos. También, en muchos casos, el agente que se suministre a una célula de acuerdo con la presente invención, puede someterse a uno o más etapas de procesamiento antes de convertirse en un agente supresor activo (véase más adelante para una discusión adicional); en tales casos, aquellas personas ordinariamente capacitadas en este campo apreciarán que el agente relevante preferiblemente se diseñará para incluir secuencias que puedan ser necesarias para su procesamiento.

40 Las enfermedades mediadas por la disfunción del canal de sodio epitelial incluyen las enfermedades asociadas con la regulación de los volúmenes de fluido a través de las membranas epiteliales. Por ejemplo, el volumen de líquido superficial de las vías respiratorias es un regulador clave de la eliminación mucociliar y del mantenimiento de la salud del los pulmones. El bloqueo del canal de sodio epitelial promoverá la acumulación de fluido sobre el lado mucoso del epitelio de las vías respiratorias, promoviendo de esta manera la eliminación de moco, e impidiendo la acumulación de moco y de esputo en los tejidos respiratorios (incluyendo las vías respiratorias pulmonares). Estas enfermedades incluyen enfermedades respiratorias, tales como fibrosis quística, disquinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, infecciones del tracto respiratorio (agudas y crónicas; virales y bacterianas), y carcinoma pulmonar. Las enfermedades mediadas por el bloqueo del canal de sodio epitelial también incluyen enfermedades diferentes de las enfermedades respiratorias que están asociadas con la regulación anormal de fluido a través del epitelio, tal vez involucrando una fisiología anormal de los líquidos superficiales protectores sobre su superficie, por ejemplo xerostomía (boca seca) o queratoconjuntivitis sica (ojo seco). Adicionalmente, el bloqueo del canal de sodio epitelial en el riñón se podría utilizar para promover la diuresis y de esta manera inducir un efecto hipotensivo.

50 El tratamiento puede ser sintomático o profiláctico.

El asma incluye asma tanto intrínseca (no alérgica) como asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma severa, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma ocupacional, y asma inducida en seguida de infección bacteriana. También se debe entender que el tratamiento de asma abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 o 5 años de edad, que exhiban síntomas de sibilancia, y que sean diagnosticados o puedan

ser diagnosticados como "bebés con sibilancia", una categoría de paciente establecida de importante preocupación médica y ahora identificada con frecuencia como de asmáticos incipientes o en fase temprana. (Para mayor conveniencia, esta condición asmática particular es denominada como "síndrome de bebé con sibilancia").

5 La eficiencia profiláctica en el tratamiento de asma será evidenciada por una frecuencia o severidad reducida del ataque sintomático, por ejemplo de ataque asmático agudo o broncoconstrictor, mejoría en la función pulmonar, o mejor hiperreactividad de las vías respiratorias. Además se puede evidenciar por un requerimiento reducido de otra  
 10 terapia sintomática, es decir, terapia para, o pretendida para restringir o abortar un ataque sintomático cuando se presente, por ejemplo antiinflamatorio (por ejemplo, corticosteroide) o broncodilatador. El beneficio profiláctico en asma, en particular, puede ser evidente en los sujetos susceptibles al "ahogamiento matutino". El "ahogamiento matutino" es un síndrome asmático reconocido, común a un porcentaje sustancial de asmáticos, y caracterizado por  
 15 ataque de asma, por ejemplo entre las horas de aproximadamente de las 4 y las 6 am, es decir, en un momento por lo regular sustancialmente distante de cualquier terapia para el asma sintomática previamente administrada.

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

Con base en los resultados mostrados en la presente invención, la presente divulgación proporciona agentes de  
 25 ARNi que reducen la expresión de alfa-ENaC en células cultivadas y en un sujeto, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un ser humano. Las Tablas 1A - 1D proporcionan ejemplos de agentes de ARNi que se dirigen al alfa-ENaC, con base en las abreviaturas de la nomenclatura estándar suministradas en la Tabla A.

La Tabla 1A, SEQ ID NOs: 305 - 608, la Tabla 1B, y la Tabla 1D, SEQ ID NOs: 1519 - 1644, enlistan los ARNi corto que no incluyen modificaciones de nucleótidos, excepto por un enlace fosforotioato entre el terminal 3' y las  
 30 penúltimas timidinas. Las SEQ ID restantes en las Tablas 1A - 1D enlistan los ARNi corto en donde todos los nucleótidos que contienen bases de pirimidina son nucleótidos modificados por 2'-O-metilo en la cadena sentido, y todas las uridinas en un contexto de secuencia de 5'-ua-3', así como todas las citidinas en un contexto de secuencia de 5'-ca-3', son nucleótidos modificados por 2'-O-metilo en la cadena antisentido.

Con base en estos resultados, la invención proporciona específicamente un agente de ARNi que incluye una cadena  
 35 sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias de la cadena sentido de los agentes proporcionados en las Tablas 1A - 1D, y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias antisentido de los agentes proporcionados en las Tablas 1A - 1D.

Los agentes de ARNi mostrados en las Tablas 1A - 1D se componen de dos cadenas de 19 nucleótidos de longitud, las cuales son complementarias o idénticas a la secuencia objetivo, más una 3'-TTI que sobresale. La presente  
 40 invención proporciona agentes que comprenden al menos 15, o al menos 16, 17 o 18, o 19 nucleótidos contiguos a partir de estas secuencias. Sin embargo, aunque estas longitudes pueden ser potencialmente óptimas, los agentes de ARNi no pretenden limitarse a estas longitudes. La persona experta está bien consciente de que agentes de ARNi más cortos o más largos pueden ser similarmente efectivos, debido a que, dentro de ciertos intervalos de longitud, la eficacia es más bien una función de la secuencia de nucleótidos que de la longitud de la cadena. Por  
 45 ejemplo, Yang, y colaboradores, PNAS 9929942-9947 (2002,), demostraron eficacias similares para agentes de ARNi de longitudes entre 21 y 30 pares de bases. Otros han demostrado un silenciamiento efectivo de genes mediante agentes de ARNi bajando hasta una longitud de aproximadamente 15 pares de bases (Byrom, y  
 50 colaboradores, "Inducing RNAi with siRNA Cocktails Generated by RNase III" Tech Notes 10 (1), Ambion, Inc., Austin, TX).

Por consiguiente, es posible y es contemplado seleccionar a partir de las secuencias proporcionadas en las Tablas  
 55 1A - 1D, una secuencia parcial entre 15 y 19 nucleótidos para la generación de un agente de ARNi derivado a partir de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A - 1D. De una manera alternativa, se pueden añadir uno o varios nucleótidos a una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1A - 1D, o un agente que contenga 15 nucleótidos contiguos a partir de uno de estos agentes, preferiblemente, pero no necesariamente, de tal forma que los nucleótidos agregados sean complementarios con la respectiva secuencia del gen objetivo, por ejemplo, alfa-  
 60 ENaC. Por ejemplo, los primeros 15 nucleótidos a partir de uno de los agentes se pueden combinar con los 8 nucleótidos que se encuentran 5' con esta secuencia en el ARNm para alfa-ENaC, para obtener un agente con 23 nucleótidos en las cadenas sentido y antisentido. Todos estos agentes de ARNi derivados se incluyen en los agentes de ARNi, siempre y cuando retengan esencialmente la capacidad para inhibir la replicación de alfa-ENaC en células humanas cultivadas.

La cadena antisentido de un agente de ARNi debe ser igual a, o de al menos, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, o 50  
 65 nucleótidos de longitud. Debe ser igual a, o menor de 60, 50, 40, o 30 nucleótidos de longitud. Los intervalos

preferidos son de 15 a 30, de 17 a 25, de 19 a 23, y de 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La cadena sentido de un agente de ARNi de ser igual, o de al 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 intervalos preferidos son de 15 a 30, de 17 a 25, de 19 a 23, y de 19 a 21 nucleótidos de longitud.

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

10 En general, los agentes de ARNi incluyen una región de suficiente complementariedad para el ARNm para alfa-ENaC, y son de una longitud suficiente en términos de nucleótidos, para que el agente de ARNi, o un fragmento del mismo, pueda mediar la subregulación del gen para alfa-ENaC. No es necesario que exista una complementariedad perfecta entre el agente de ARNi y el gen objetivo, pero la correspondencia debe ser suficiente para hacer posible que el agente de ARNi, o un producto de disociación del mismo, dirija el silenciamiento específico de la secuencia, por ejemplo, mediante la disociación del ARNi de un ARNm para alfa-ENaC.

15 Por consiguiente, los agentes de ARNi incluyen los agentes que comprenden una cadena sentido y una cadena antisentido, cada una comprendiendo una secuencia de al menos 16, 17, o 18 nucleótidos, que sea esencialmente idéntica, como se define más adelante, a una de las secuencias de las Tablas 1A - 1D, excepto que no más de 1, 2, o 3 nucleótidos por cadena, respectivamente, hayan sido sustituidos por otros nucleótidos (por ejemplo, adenosina reemplazada por uracilo), mientras que retengan esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC en células humanas cultivadas. Estos agentes poseen por lo tanto al menos 15 nucleótidos idénticos a una de las secuencias de las Tablas 1A - 1D, pero se introducen 1, 2, o 3 faltas de correspondencia de bases con respecto ya sea a la secuencia de alfa-ENaC objetivo, o bien entre las cadenas sentido y antisentido. Las faltas de correspondencia con la secuencia de ARN para alfa-ENaC objetivo, en particular en la cadena antisentido, son más toleradas en las regiones terminales, y si están presentes, 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 del terminal 3' de la cadena antisentido. La cadena sentido solamente necesita ser suficientemente complementaria con la cadena antisentido para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

30 Se prefiere que las cadenas en sentido y antisentido se escojan de tal manera que el agente de ARNi incluya una sola cadena o región no apareada en uno o ambos extremos de la molécula. Por consiguiente, un agente de ARNi contiene cadenas sentido y antisentido, preferiblemente emparejadas para contener una saliente, por ejemplo, una o dos salientes 5' o 3', pero preferiblemente una saliente 3' de 2 - 3 nucleótidos. La mayoría de las formas de realización tendrán una saliente 3'. Los agentes de ARNi corto preferidos tendrán salientes monocatenarias, preferiblemente salientes 3', de 1 a 4, o preferiblemente de 2 o 3 nucleótidos de longitud, en uno o en ambos extremos del agente de ARNi. Las salientes pueden ser el resultado de que una cadena sea más larga que la otra, o el resultado de que dos cadenas de la misma longitud estén escalonadas. Los nucleótidos no emparejados que forman la saliente puede ser ribonucleótidos, o pueden ser desoxirribonucleótidos, preferiblemente timidina. Los extremos 5' preferiblemente están fosforilados, o pueden no estar fosforilados.

40 Las longitudes preferidas para la región dúplex están entre 15 y 30, más preferiblemente de 18, 19, 20, 21, 22, y 23 nucleótidos de longitud, por ejemplo, en el intervalo del agente de ARNi corto discutido anteriormente. Los agentes de ARNi corto pueden parecerse en longitud y estructura a los productos procesados naturales Dicer de los ARN bc largos. Las formas de realización en donde se enlazan las dos cadenas del agente de ARNi corto, por ejemplo, donde se enlazan de una manera covalente, también están incluidas. Las estructuras de cadena de horquilla, u otras monocatenarias, que proporcionan la región bicatenario preferida, y preferiblemente una saliente 3', también están dentro de la invención.

Evaluación de los agentes de ARNi candidatos

50 Como se anotó anteriormente, la presente invención proporciona un sistema para identificar los ARNi corto que son útiles como inhibidores de alfa-ENaC. Ya que, como se observó anteriormente, los shARN se procesan en forma intracelular para producir los ARNi corto que tienen porciones dúplex con la misma secuencia que la estructura del tronco 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 ARNi corto, pero el sistema también abarca los shARN correspondientes. Específicamente, la presente invención demuestra la preparación exitosa de los ARNi corto destinados a inhibir la actividad de alfa-ENaC. Las técnicas y reactivos descritos en la presente invención se pueden aplicar fácilmente para diseñar nuevos ARNi corto potenciales, dirigidos a otros genes o regiones genéticas, y probados para determinar su actividad en la inhibición del alfa-ENaC, como se discute en la presente invención.

5 En diferentes formas de realización, los inhibidores potenciales de alfa-ENaC se pueden probar para determinar la supresión de la expresión endógena de alfa-ENaC, mediante la introducción de ARNi corto candidato(s) en las células (por ejemplo, mediante administración exógena, o mediante la introducción de un vector o construcción que dirija la síntesis endógena del ARNi corto en la célula), o en animales de laboratorio, mediante administración pulmonar o nasal. Alternativamente, los inhibidores potenciales de alfa-ENaC se pueden probar *in vitro* mediante la cotransfección transitoria de el(los) ARNi corto candidato(s), junto con un plásmido de expresión de alfa-ENaC. Se evalúa entonces la capacidad de el(los) ARNi corto candidato(s) para reducir los niveles de transcripción objetivo y/o para inhibir o suprimir uno o más aspectos o características de la actividad del alfa-ENaC, tales como la diferencia de potencial epitelial o la absorción de fluido superficial de las vías respiratorias.

10 Se pueden comparar células o animales de laboratorio a los que se les ha suministrado las composiciones de ARNi corto de la invención (células/animales de prueba), con células o animales de laboratorio similares o comparables que no hayan recibido la composición de la invención (células/animales de control, por ejemplo células/animales que no hayan recibido ni ARNi corto ni ARNi corto de control, tal como un ARNi corto dirigido a una transcripción no endógena, tal como la proteína fluorescente verde (GFP)). El fenotipo de transporte de iones de las células/animales de prueba, se puede comparar con el fenotipo de las células/animales de control, siempre y cuando el ARNi corto de la invención comparta la reactividad cruzada de secuencia con los tipos/especies de células de prueba. La producción de la proteína de alfa-ENaC y la corriente de corto circuito (*in vitro* o *ex vivo*) se pueden comparar en las células/animales de prueba en relación con las células/animales de control. De forma similar, se pueden comparar otros indicios de la actividad de alfa-ENaC, incluyendo la diferencia de potencial epitelial *ex vivo*, o la eliminación mucociliar *in vivo*, o la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) del cuerpo completo. En términos generales, las células/animales de prueba y las células/animales de control serían de la misma especie, y, para las células, de un tipo de célula similar o idéntico. Por ejemplo, se podrían comparar las células de la misma línea celular. Cuando la célula de prueba es una célula primaria, típicamente la célula de control también sería una célula primaria.

25 Por ejemplo, la capacidad de ARNi corto candidato para inhibir la actividad de alfa-ENaC se puede determinar de una forma conveniente mediante (i) el suministro del ARNi corto candidato a las células, (ii) la evaluación de los niveles de expresión del ARNm para alfa-ENaC en relación con un gen de control expresado en forma endógena, (iii) la comparación de la corriente sensible a la amilorida en un modelo celular *in vitro* producido en la presencia del ARNi corto con la cantidad producida en ausencia del ARNi corto. Éste último ensayo se puede utilizar para probar los ARNi corto que se dirijan a cualquier transcripto objetivo que pueda tener influencia sobre la actividad de alfa-ENaC indirectamente, y no se limita a los ARNi corto que se dirigen a los transcriptos que codifican las subunidades del canal de ENaC.

35 La capacidad de un ARNi corto candidato para reducir el nivel de transcripto objetivo se puede evaluar midiendo la cantidad del transcripto objetivo, utilizando, por ejemplo, transferencias tipo Northern, ensayos de protección de nucleasa, hibridación de sondas, PCR de transcripción inversa (RT), RT-PCR en tiempo real, análisis de microarreglos, etc. La capacidad de un ARNi corto candidato para inhibir la producción de un polipéptido codificado por el transcripto objetivo (ya sea al nivel transcripcional o post-transcripcional) se puede medir empleando una variedad de enfoques basados en anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, transferencias tipo Western, inmunoensayos, ELISA, citometría de flujo, microarreglos de proteína, etc. En general, se puede emplear cualquier método para medir la cantidad de transcripto objetivo, o bien de un polipéptido codificado por el transcripto objetivo.

40 En general, ciertos inhibidores de Alfa-ENaC por medio de ARNi preferidos reducen el nivel de transcripto objetivo al menos aproximadamente 2 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 4 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 16 veces, al menos aproximadamente 64 veces, o inclusive hasta un mayor grado en relación con el nivel que estaría presente en ausencia del inhibidor (por ejemplo, en una célula de control comparable que carezca del inhibidor). En general, ciertos inhibidores de Alfa-ENaC por medio de ARNi preferidos inhiben la actividad del canal de ENaC, de tal manera que la actividad es más 'baja en una célula que contenga al inhibidor que en una célula de control que no contenga al inhibidor por al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente cuatro veces, más preferiblemente al menos aproximadamente ocho veces, al menos aproximadamente dieciséis veces, al menos aproximadamente 64 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o inclusive hasta un mayor grado.

55 Ciertos inhibidores preferidos de alfa-ENaC por medio de ARNi inhiben la actividad del canal de ENaC durante al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 120 horas, al menos 144 horas, o al menos 168 horas, luego de la administración del ARNi corto y de la infección de las células. Ciertos inhibidores preferidos de alfa-ENaC previenen (es decir, reducen hasta niveles indetectables), o reducen de una manera significativa la actividad de alfa-ENaC durante al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, o al menos 60 horas luego de la administración del ARNi corto. De acuerdo con diferentes modalidades de la invención, una reducción significativa en la actividad de alfa-ENaC, es una reducción hasta aproximadamente menos del 90% del nivel que se presentaría en ausencia del ARNi corto, una reducción hasta aproximadamente menos del 75 del nivel que se presentaría en ausencia del ARNi corto, una



reducción de aproximadamente menos del 50% del nivel que se presentaría en ausencia del ARNi corto, una reducción de aproximadamente menos del 25% del nivel que se presentaría en ausencia del ARNi corto, o una reducción hasta aproximadamente menos del 10% del nivel que se presentaría en ausencia del ARNi corto. La reducción en la actividad de alfa-ENaC se puede medir utilizando cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a la medición de la corriente de corto circuito de la sensibilidad a la amilorida *in vitro*, la diferencia del potencial epitelial *ex vivo* o *in vivo* en la eliminación mucociliar en el MRI pulmonar/de todo el cuerpo.

#### Prueba de estabilidad, modificación, y nueva prueba de agentes de ARNi

Un agente de ARNi candidato se puede evaluar con respecto a la estabilidad, por ejemplo su susceptibilidad a la disociación mediante una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando se introduce el agente de ARNi en el cuerpo de un sujeto. Se pueden emplear métodos para identificar los sitios que sean susceptibles a la modificación, en particular a la disociación, por ejemplo a la disociación mediante un componente que se encuentra en el cuerpo de un sujeto. Tales métodos pueden incluir el aislamiento y la identificación de los fragmentos más abundantes formados por la degradación del agente de ARNi candidato después de su incubación con medios biológicos aislados *in vitro*, por ejemplo suero, plasma, esputo, fluido cerebroespinal, u homogenatos celulares o tisulares, o después de poner en contacto a un sujeto con el agente de ARNi candidato *in vivo*, identificando de esta manera los sitios susceptibles a la disociación. Estos métodos se encuentran, por ejemplo, sin limitación, en la publicación de la solicitud de patente internacional No WO 2005115481, presentada el 27 de mayo de 2005.

Cuando se identifican los sitios susceptibles a la disociación, se puede diseñar y/o sintetizar un agente de ARNi adicional, en donde el sitio de disociación potencial se haga resistente a la disociación, por ejemplo, mediante la introducción de una modificación 2' en el sitio de la disociación, por ejemplo, un grupo 2'-O-metilo. Este agente de ARNi adicional se puede volver a probar para determinar su estabilidad, y este proceso se puede repetir hasta encontrar un agente de ARNi que exhiba la estabilidad deseada.

#### Prueba *in vivo*

Un agente de ARNi identificado como capaz de inhibir la expresión del gen para alfa-ENaC, se puede probar para determinar su funcionalidad *in vivo* en un modelo animal (por ejemplo, en un mamífero, tal como en un ratón, rata, cobayo, o primate). Por ejemplo, el agente de ARNi se puede administrar a un animal, y el agente de ARNi se puede evaluar con respecto a su biodistribución, estabilidad, y a su capacidad para inhibir la expresión de alfa-ENaC, o para modular un proceso biológico o patológico mediado al menos en parte por alfa-ENaC.

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

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

El agente de ARNi se puede evaluar con respecto a su capacidad para subregular la expresión de alfa-ENaC. Los niveles de expresión del gen para alfa-ENaC *in vivo* se pueden medir, por ejemplo, mediante hibridación *in situ*, o mediante el aislamiento del ARN a partir del tejido antes y después de la exposición al agente de ARNi. Cuando el animal necesita ser sacrificado con el objeto de cosechar el tejido, un animal de control no tratado servirá para la comparación. El ARN para alfa-ENaC se puede detectar mediante cualquier método deseado, incluyendo, pero sin limitarse a, RT-PCR, transferencia tipo Northern, ensayo de ADN ramificado, o ensayo de protección de ARNasa. Alternativamente, o adicionalmente, se puede monitorear la expresión del gen para alfa-ENaC llevando a cabo el análisis de transferencia tipo Western, o inmunocoloración sobre extractos de tejido tratados con el agente de ARNi.

Los inhibidores potenciales de alfa-ENaC se pueden probar empleando una variedad de modelos animales que se han desarrollado. Se pueden administrar a un animal composiciones que comprendan ARNi corto candidato(s), construcciones o vectores capaces de dirigir la síntesis de tales ARNi corto dentro de una célula huésped, o células modificadas o manipuladas por ingeniería genética para contener los ARNi corto candidatos. Se evalúa la capacidad de la composición para suprimir la expresión de alfa-ENaC, y/o para modificar los fenotipos dependientes de ENaC, y/o para disminuir su severidad en relación con los animales que no hayan recibido el inhibidor potencial de alfa-ENaC. Estos modelos incluyen, pero no se limitan a, modelos de mudo, rata, cobayo, oveja, y primates no humanos para los fenotipos dependientes de ENaC, todos los cuales son conocidos en la técnica, y se utilizan para probar la eficacia de los productos terapéuticos potenciales de alfa-ENaC.

Utilizando los sistemas inventados para la identificación de los agentes terapéuticos candidatos de ARNi corto, se seleccionan los agentes terapéuticos adecuados a partir de los identificadores Dúplex ND-8302, ND-8332, ND-8348, ND-8356, ND-8357, ND-8373, ND-8381, ND-8396, ND-8450, y ND-8453, más adecuadamente seleccionados a partir de ND-8356, ND-8357 y ND-8396.

## 5 Química del ARNi

En la presente invención se describen agentes de ARNi aislados, por ejemplo los agentes de ARN bc, que median el ARNi para inhibir la expresión del gen para alfa-ENaC.

Los agentes de ARN discutidos en la presente invención incluyen o bien el ARN no modificado, así como el ARN que ha sido modificado, por ejemplo, para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósidos. Un ARN no modificado se refiere a una molécula en donde los componentes del ácido nucleico, es decir, azúcares, bases, y fracciones de fosfato, son los mismos o esencialmente los mismos que aquéllos que se presentan en la naturaleza, preferiblemente como se presentan naturalmente en el cuerpo humano. En el estado del arte se denomina como raro o inusual, pero de origen natural, los ARN como los ARN modificados; véase, por ejemplo, Limbach y colaboradores, Nucleic Acids Res. 22: 2183 - 2196, 1994. Tales ARN raros o inusuales, a menudo denominados como ARN modificados (aparentemente debido a que son típicamente el resultado de una modificación posterior a la transcripción), están dentro del término de ARN no modificado, como se utiliza en la presente invención. El ARN modificado, como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula en donde uno o más de los componentes del ácido nucleico, es decir, azúcares, bases, y fracciones de fosfato, son diferentes de aquéllos que se presentan en la naturaleza, preferiblemente diferentes de aquéllos que se presentan en el cuerpo humano. Aunque se denominan como "ARN" modificados, desde luego, debido a la modificación, incluyen moléculas que no son ARN. Los sustitutos de nucleósidos son moléculas en donde la estructura base de ribofosfato es reemplazada con una construcción que no es ribofosfato, que permite que las bases se presenten en la relación espacial correcta, de tal modo que la hibridación es sustancialmente similar a la que se ve con una estructura base de ribofosfato, por ejemplo, miméticos no cargados de la estructura principal de ribofosfato. Los ejemplos de lo anterior se discuten en la presente invención.

Las modificaciones descritas en la presente invención se pueden incorporar en cualquier ARN bicatenario y molécula del tipo ARN descrita en la presente invención, por ejemplo un agente de ARNi. Puede ser deseable modificar una o ambas de las cadenas antisentido y sentido de un agente de ARNi. Debido a que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas más adelante se presentan en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, por ejemplo una modificación de una base, o una fracción de fosfato, o el oxígeno no enlazante de una fracción de fosfato. En algunos casos, la modificación se presentará en todas las posiciones objetivo en el ácido nucleico, pero en muchos, y de hecho en la mayoría de los casos, no lo harán. A manera de ejemplo, una modificación solamente puede presentarse en una posición terminal 3' o 5', solamente puede presentarse en una región terminal, por ejemplo, en una posición sobre un nucleótido terminal, o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación puede presentarse en una región bicatenaria, o en una región monocatenaria, o en ambas. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición de O no enlazante, solamente puede presentarse en uno o ambos terminales, y solamente puede presentarse en las regiones terminales, por ejemplo en una posición sobre un nucleótido terminal, o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede presentarse en las regiones bicatenarias y monocatenarias, en particular en los terminales. De una manera similar, puede presentarse una modificación sobre la cadena sentido, sobre la cadena antisentido, o sobre ambas. En algunos casos, las cadenas sentido y antisentido tendrán las mismas modificaciones o la misma clase de modificaciones, pero en otros casos, las cadenas sentido y antisentido tendrán diferentes modificaciones, por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable modificar solamente una cadena, por ejemplo la cadena sentido.

Dos objetivos primordiales para la introducción de las modificaciones en los agentes de ARNi es su estabilización hacia la degradación en los medios ambientes biológicos, y la mejora de las propiedades farmacológicas, por ejemplo las propiedades farmacodinámicas, las cuales se discuten adicionalmente más adelante. Otras modificaciones adecuadas a un azúcar, base, o estructura base de un agente de ARNi, son descritas en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/01193, presentada el 16 de enero de 2004. Un agente de ARNi puede incluir una base que no sea de origen natural, tales como las bases descritas en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/011822, presentada el 16 de abril de 2004. Un agente de ARNi puede incluir un azúcar que no sea de origen natural, tal como una molécula portadora cíclica que no sea un carbohidrato. Las características que sirven de ejemplo de los azúcares que no son de origen natural para utilizarse en los agentes de ARNi, se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/11829, presentada el 16 de abril de 2003.

Un agente de ARNi puede incluir un enlace entre nucleótidos (por ejemplo, el enlace fosforotioato quiral), útil para aumentar la resistencia a la nucleasa. Además, o en forma alternativa, un agente de ARNi puede incluir un mimético de ribosa para una mayor resistencia a la nucleasa. Los ejemplos de enlaces entre nucleótidos y los miméticos de ribosa para una mayor resistencia a la nucleasa, se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070,

presentada el 8 de marzo de 2004.

Un agente de ARNi puede incluir subunidades de monómeros conjugados con ligando y monómeros para la síntesis de oligonucleótidos. Los monómeros de ejemplo se describen en la Solicitud de los Estados Unidos No. 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004.

- 5 Un agente de ARNi puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Un agente de ARNi puede formar un complejo con una fracción anfipática. Los ejemplos de fracciones anfipáticas de para ser utilizadas con los agentes de ARNi se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

- 10 En ora forma de realización, el agente de ARNi puede formar complejo con un agente de suministro que proporcione un complejo modular. El complejo puede incluir un agente portador enlazado con uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente los tres de): (a) un agente de condensación (por ejemplo, un agente capaz de atraer, por ejemplo enlazar, un ácido nucleico, por ejemplo a través de interacciones iónicas o electrostáticas); (b) un agente fusogénico (por ejemplo, un agente capaz de fusionarse y/o de ser transportado a través de una membrana celular); y (c) un grupo direccionador, por ejemplo, un agente direccionador a células o tejidos, por ejemplo una lectina, glicoproteína, lípido, o proteína, por ejemplo un anticuerpo, que se enlace con un tipo de célula especificado. Los agentes de ARN que forman complejo con un agente de suministro se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

- 20 Un agente de ARNi puede tener apareamientos no canónicos, tales como entre las secuencias sentido y antisentido del dúplex de ARNi. Las características que sirven de ejemplo de agentes de ARNi no canónicos se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Mejor resistencia a la nucleasa

Un agente de ARNi, por ejemplo un agente de ARNi que elija como objetivo al alfa-ENaC, puede tener una mejor resistencia a las nucleasas.

- 25 Una forma de aumentar la resistencia es identificar los sitios de disociación, y modificar tales sitios para inhibir la disociación, como se describe en la Solicitud de los Estados Unidos No. 60/559.917, presentada el 4 de mayo de 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 disociación. En ciertas formas de realización, todas las pirimidinas de un agente de ARNi portan una modificación 2' ya sea en la cadena sentido, en la cadena antisentido, o en ambas cadenas, y, por consiguiente, el agente de ARNi tiene una mejor resistencia a las endonucleasas. También se puede lograr una mejor resistencia a la nucleasa mediante la modificación del nucleótido 5', dando como resultado, por ejemplo, al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido de 5'-citidina-citidina-3' (5'-cc-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', como se describe en la Solicitud Internacional No. PCT/US2005/O18931, presentada el 27 de mayo de 2005. El agente de ARNi puede incluir al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5 de tales dinucleótidos. En una forma de realización particularmente preferida, el nucleótido 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencias 5'-ua-3' y 5'-ca-3', ya sea en la cadena sentido, en la cadena antisentido, o en ambas cadenas, es un nucleótido modificado. Preferiblemente, el nucleótido 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencia 5'-ua-3', 5'-ca-3', y 5'-ug-3', ya sea en la cadena sentido, en la cadena antisentido, o en ambas cadenas, es un nucleótido modificado. Más preferiblemente, todos los nucleótidos de pirimidina en la cadena sentido son nucleótidos modificados, y el nucleótido 5' en todas las apariciones de los motivos de secuencia 5'-ua-3' y 5'-ca-3' en la cadena antisentido, son nucleótidos modificados, o en donde la cadena antisentido no incluye ni un motivo 5'-ua-3' ni 5'-ca-3', en todas las apariciones del motivo de secuencia 5'-ug-3'.

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

- 50 Los ejemplos de las 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 cuales el hidroxilo 2' se conecta, por ejemplo, mediante un puente de metileno, con el carbono 4' del mismo azúcar de ribosa; O-AMINA y aminoalcoxi,  $O(CH_2)_nAMINA$ , (por ejemplo, AMINA =  $NH_2$ ; alquilamino, dialquilamino, heterocicilamino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilén

diamina, poliamino). Vale la pena observar que los oligonucleótidos que contienen solamente el grupo metoxietilo (MOE), (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, un derivado de PEG), exhiben estabilidades de nucleasa comparables a aquéllas modificadas con la modificación robusta de fosfortioato.

5 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir, azúcares de desoxirribosa, que son de una relevancia particular para las porciones que sobresalen de los ARN bc parciales); halógeno (por ejemplo, flúor), amino (por ejemplo, NH<sub>2</sub>; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido); NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-AMINA (AMINA = NH<sub>2</sub>; alquilamino, dialquilamino, heterocicililamino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino), NHC(O)R (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenoilo, y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con una función amino.

Los sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, y 2'-flúor.

15 La inclusión de los azúcares de furanosa en la estructura base del oligonucleótido también puede disminuir la disociación endonucleolítica. Un agente de ARNi se puede modificar adicionalmente mediante la inclusión de un grupo catiónico 3', o invirtiendo el nucleósido en el terminal 3' con un enlace 3'-3'. En otra forma de realización alternativa, el terminal 3' se puede bloquear con un grupo aminoalquilo, por ejemplo, un aminoalquilo dT de 5 carbonos 3'. Otros conjugados de 3' pueden inhibir la disociación exonucleolítica de 3'-5'. Aunque sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, un conjugado de 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la disociación exonucleolítica mediante el bloqueo estérico de la exonucleasa para que no se enlace con el extremo 3' del oligonucleótido. Inclusive pequeñas cadenas de alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos, o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear las exonucleasas de 3'-5'.

20 La disociación nucleolítica también se puede inhibir mediante la introducción de modificaciones del enlazador de fosfato, por ejemplo enlaces fosfortioato. Por consiguiente, los agentes de ARNi preferidos incluyen dímeros de nucleótidos enriquecidos o puros para una forma quiral particular de un grupo fosfato modificado que contenga un heteroátomo en una posición que no sea de formación de puente normalmente ocupada por el oxígeno. El heteroátomo puede ser S, Se, Nr<sub>2</sub>, o Br<sub>3</sub>. Cuando el heteroátomo es S, se prefiere el enlace Sp quiralmente puro o enriquecido. Enriquecido significa al menos 70, 80, 90, 95, o 99% de la forma preferida. Los enlaces fosfato modificados son particularmente eficientes para inhibir la disociación exonucleolítica cuando se introducen cerca de las posiciones de los terminales 5' o 3', y preferiblemente las posiciones del terminal 5', de un agente de ARNi.

30 Los conjugados de 5' también pueden inhibir la disociación exonucleolítica de 5'-3'. Aunque sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, un conjugado de 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la disociación exonucleolítica mediante el bloqueo estérico de la exonucleasa para que no se enlace con el extremo 5' del oligonucleótido. Inclusive las cadenas de alquilo pequeñas, los grupos arilo, o los conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear las exonucleasas de 3'-5'.

35 Un agente de ARNi puede tener una mayor resistencia a las nucleasas cuando un agente de ARNi dúplex incluye un nucleótido bicatenario que sobresale en al menos un extremo. En las formas de realización preferidas, el nucleótido que sobresale incluye de 1 a 4, preferiblemente de 2 a 3 nucleótidos no apareados. En una forma de realización preferida, el nucleótido no apareado de la cadena monocatenaria que pende que está directamente adyacente al par de nucleótidos terminales, contiene una base de purina, y el par de nucleótidos terminales es un par G-C, o al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares de G-C. En las forma de realización adicionales, el nucleótidos que sobresale puede tener 1 o 2 nucleótidos no apareados, y en la forma de realización que sirve de ejemplo, el nucleótido que sobresale es 5'-gc-3'. En forma de realización preferidas, el nucleótido qu sobresale está sobre el extremo 3' de la cadena antisentido. En una forma de realización, el agente de ARNi incluye el motivo 5'-cgc-3' sobre el extremo 3' de la cadena antisentido, de tal manera que se forma una cadena que sobresale de dos nucleótidos 5'-gc-3'.

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

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

5 Las modificaciones de NRM incluyen algunas que se pueden colocar solamente en el terminal, y otras que pueden ir en cualquier posición. Algunas modificaciones de NRM pueden inhibir la hibridación, de tal manera que es preferible utilizarlas solamente en las regiones terminales, y preferiblemente no utilizarlas en el sitio de disociación o en la región de disociación de una secuencia que dirija una secuencia objetivo o gen, en particular sobre la cadena antisentido. Se pueden utilizar en cualquier parte en la cadena sentido, siempre y cuando se mantenga suficiente hibridación entre las dos cadenas del agente de ARNi bc. En algunas formas de realización, es deseable poner el NRM en el sitio de disociación o en la región de disociación de una cadena sentido, debido a que puede minimizar el silenciamiento fuera del objetivo.

10 En la mayoría de los casos, las modificaciones de NRM se distribuirán en forma diferente, dependiendo de si están comprendidas sobre una cadena sentido o antisentido. Si están sobre una cadena antisentido, no se deben insertar modificaciones que interfieran con, o que inhiban la disociación con endonucleasa, en la región que sea sometida a disociación mediada por RISC, por ejemplo el sitio de disociación o la región de disociación (como se describe en Elbashir y colaboradores, 2001, Genes and Dev. 15: 188, que se incorpora a la presente como referencia). La disociación del objetivo ocurre aproximadamente en la mitad de una cadena antisentido de 20 o 21 nucleótidos, o aproximadamente 10 u 11 nucleótidos en dirección 5' del primer nucleótido sobre el ARNm objetivo que es complementario con la cadena antisentido. Como se utiliza en la presente invención, el sitio de disociación se refiere a los nucleótidos sobre cualquier lado del sitio de disociación, sobre el objetivo o sobre la cadena del agente de ARNi que se hibrida con él. La región de disociación significa los nucleótidos dentro de 1, 2, o 3 nucleótidos del sitio de disociación, en cualquier dirección.

20 Tales modificaciones se pueden introducir en las regiones terminales, por ejemplo en la posición terminal, o con 2, 3, 4, o 5 posiciones del terminal, de una cadena sentido o antisentido.

#### Ligandos atados

25 Se puede influir o confeccionar a la medida las propiedades de un agente de ARNi, incluyendo sus propiedades farmacológicas, por ejemplo, mediante la introducción de ligandos, por ejemplo ligandos atados. Además, las propiedades farmacológicas de un agente de ARNi se pueden mejorar mediante la incorporación de un ligando en una formulación del agente de ARNi, cuando el agente de ARNi tiene o no tiene un ligando atado.

30 Se pueden atar una amplia variedad de entidades, por ejemplo ligandos, a un agente de ARNi, o se pueden utilizar como un conjugado o aditivo de una formulación, por ejemplo, con el portador de una subunidad monomérica conjugada con el ligando. Más adelante se describen ejemplos en el contexto de una subunidad monomérica conjugada con ligando, pero que es solamente la preferida, y las entidades se pueden acoplar en otros puntos con un agente de ARNi.

35 Las fracciones preferidas son ligandos, los cuales se acoplan, preferiblemente de una manera covalente, ya sea directa o indirectamente, por medio de una atadura que intervenga con el portador. En las formas de realización preferidas, el ligando se une al portador por medio de una atadura interviniente. El ligando, o el ligando atado, pueden estar presentes sobre el monómero conjugado con ligando, cuando el monómero conjugado con ligando se incorpora en la cadena en crecimiento. En algunas formas de realización, se puede incorporar el ligando en una subunidad monomérica conjugada con ligando "precursor", después de que la subunidad monomérica conjugada con ligando "precursor" se haya incorporado en la cadena en crecimiento. Por ejemplo, se puede incorporar un monómero que tenga, por ejemplo, una atadura terminada en amino, por ejemplo,  $TAP-(CH_2)_nNH_2$ , en una cadena sentido o antisentido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación de la subunidad monomérica precursora en la cadena, se puede unir posteriormente un ligando que tenga un grupo electrofílico, por ejemplo un grupo éster o aldehído de pentafluorofenilo, al monómero conjugado con ligando precursor, mediante el acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico terminal de la atadura de la subunidad monomérica conjugada con ligando precursor.

45 En formas de realización preferidas, un ligando altera la distribución, direccionamiento, o tiempo de vida de un agente de ARNi en el cual se incorpore. En formas de realización preferidas, un ligando proporciona una mejor afinidad por un objetivo seleccionado, por ejemplo una molécula, célula, o tipo de célula, compartimiento, por ejemplo un compartimiento celular o de un órgano, tejido, órgano, o región del cuerpo, por ejemplo, como se compara con una especie ausente tal como un ligando.

50 Los ligandos preferidos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación, y especificidad, y también pueden mejorar la resistencia a la nucleasa del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o de una molécula polimérica que comprenda cualquier combinación de monómeros descritos en la presente invención, y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

55 Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, por ejemplo para mejorar la absorción; compuestos de diagnóstico o grupos reporteros, por ejemplo, para monitorear la distribución; agentes de

5 entrecruzamiento; fracciones que confieran resistencia a la nucleasa; y nucleobases naturales o inusuales. Los ejemplos generales incluyen moléculas lipofílicas, lípidos, lectinas, esteroides (por ejemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), terpenos (por ejemplo, triterpenos, por ejemplo sarsasapogenina, Friedelin, ácido litocólico derivado de epifriedelanol), vitaminas, carbohidratos (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, polímeros sintéticos (por ejemplo, Oligo Lactato de 15 mer) y naturales (por ejemplo, de peso molecular bajo y medio), inulina, ciclodextrina, o ácido hialurónico), proteínas, agentes enlazantes de proteínas, moléculas destinadas a la integrina, policatiónicos, péptidos, poliaminas, e imitaciones de péptidos. Otros ejemplos incluyen ligandos receptores de células epiteliales o de ácido fólico, tales como transferrina.

10 El ligando puede ser una molécula de origen natural o reoombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), poliácido L-aspártico, poliácido L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-láctico-co-glicolado), copolímero de diviniléter - anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxi)propil)metacrilamida (HMPA), polietilén glicol (PEG), polivinil alcohol (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, poliamina pseudopeptídica, poliamina peptidomimética, poliamina de dendrímero, arginina, amidina, protamina, fracciones catiónicas, por ejemplo lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido alfa helicoidal.

20 Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, por ejemplo un agente de direccionamiento a una célula o tejido, por ejemplo una tirotropina, melanotropina, proteína A tensoactiva, carbohidrato de mucina, un poli-aminoácido glicosilado, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, o un péptido de Arg-Gly-Asp (RGD), o un mimético de péptido RGD.

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

30 El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo un fármaco, que pueda aumentar la absorción del agente de ARNI dentro de la célula, por ejemplo mediante la alteración del citoesqueleto de la célula, por ejemplo mediante la alteración de los microtúbulos, microfilamentos, y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jlaplaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, mioservina, tetraciclina.

35 En un aspecto, el ligando es un lípido, o una molécula a base de lípido. Tal molécula de lípido o a base de lípido preferiblemente se enlaza con una proteína de suero, por ejemplo albúmina de suero humano (HSA). Un ligando que se enlaza con HSA permite la distribución del conjugado con un tejido objetivo, por ejemplo tejido de hígado, incluyendo células parenquimales del hígado. Otras moléculas que pueden enlazar HSA también se pueden utilizar como ligandos. Por ejemplo, se pueden utilizar neproxina o aspirina. Un lípido o ligando basado en lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte hacia una célula o membrana celular objetivo, y/o (c) se puede utilizar para ajustar el enlazamiento con una proteína de suero, por ejemplo HSA.

40 Un ligando a base de lípido se puede utilizar para modular, por ejemplo para controlar el enlazamiento del conjugado con un tejido objetivo. Por ejemplo, un lípido o un ligando a base de lípido que se enlaza con HSA más fuertemente, tendrá menos posibilidades de dirigirse hacia el riñón, y por consiguiente, menos probabilidades de ser eliminado del cuerpo.

45 En una forma de realización preferida, el ligando a base de lípido se enlaza con HSA. Preferiblemente, se enlaza con HSA con una afinidad suficiente para que el conjugado se distribuya preferiblemente hacia un tejido que no sea el riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que no se pueda revertir el enlace del ligando de HSA.

50 En otro aspecto, el ligando es una fracción, por ejemplo una vitamina o un nutriente, que es absorbido por una célula objetivo, por ejemplo una célula en proliferación. Éstos son particularmente útiles para el tratamiento de los trastornos caracterizados por una proliferación celular indeseada, por ejemplo del tipo maligno o no maligno, por ejemplo células cancerosas. Los ejemplos de vitaminas incluyen vitamina A, E, y K. Otros ejemplos de vitaminas incluyen las vitaminas B, por ejemplo ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas.

55

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un ejemplo de agente es un péptido, tal como tat o antenapedia. Si el agente es un péptido, se puede modificar, incluyendo un mimético de peptídico, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudo-peptídicos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal preferiblemente es un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una fase lipofóbica. El agente de permeación celular se puede enlazar covalentemente al agente de ARNi, o puede ser parte de un complejo de ARNi-péptido.

#### Modificaciones de fosfato 5'

En formas de realización preferidas, los agentes de ARNi están 5' fosforilados, o incluyen un análogo de fosforilo en el terminal principal 5'. Las modificaciones del fosfato 5' de la cadena antisentido incluyen aquéllas que son compatibles con el silenciamiento del gen mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa de 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 (fosfortioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'); 5'-fosfortiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato, y trifosfato reemplazados por oxígeno/azufre (por ejemplo, 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-); 5'-alquiléterfosfonatos (R = alquiléter = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5'-).

La cadena sentido se puede modificar con el objeto de inactivar la cadena sentido y prevenir la formación de un RISC activo, reduciendo de esta manera potencialmente los efectos fuera del objetivo. Esto se puede lograr mediante una modificación que impida la fosforilación 5' de la cadena sentido, por ejemplo mediante la modificación con un ribonucleótido de 5'-O-metilo (véase, Nykänen y colaboradores, (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309 - 321). También se pueden emplear otras modificaciones que impidan la fosforilación, por ejemplo simplemente sustituyendo el 5'-OH por H en lugar de O-Me. Alternativamente, se puede agregar un grupo voluminoso grande al 5'-fosfato, convirtiéndolo en un enlace de fosfodiéster.

#### Nucleobases no naturales

El nitropirrolilo y el nitroindolilo son nucleobases no naturales que son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquéllos compuestos que pueden reemplazar a cualquiera de las cuatro bases que se presentan naturalmente, sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión o la actividad del dúplex de oligonucleótidos. En contraste con la estabilización, las interacciones de enlazamiento de hidrógeno asociadas con las nucleobases de origen natural, se postula que los dúplexes de oligonucleótidos que contienen nucleobases de 3-nitropirrolilo se estabilizan exclusivamente mediante las interacciones de apilación. La ausencia de interacciones de enlace de hidrógeno significativas con las nucleobases de nitropirrolilo obvia la especificidad para una base complementaria específica. Además, diferentes reportes confirman que el 4-, 5-, y 6-nitroindolilo exhiben muy poca especificidad por las cuatro bases naturales. De manera muy interesante, un dúplex de oligonucleótido que contenga 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 hipoxantínico, isoinosínico, 2-aza-inosínico, 7-desaza-inosínico, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobenzimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, y los derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, incluyendo los procedimientos sintéticos, de nitropirrolilo, nitroindolilo, y otras bases universales mencionadas anteriormente, véase Vallone y colaboradores, Nucleic Acids Research, 27(17): 3589 - 3596 (1999); Loakes y colaboradores, J. Mol. Bio., 270: 426 - 436 (1997); Loakes y colaboradores, Nucleic Acids Research, 22(20): 4039 - 4043 (1994); Oliver y colaboradores, Organic Letters, Vol. 3(13): 1977 - 1980 (2001); Amosova y colaboradores, Nucleic Acids Research, 25(10): 1930 - 1934 (1997); Loakes y colaboradores, Nucleic Acids Research, 29(12): 2437 - 2447 (2001); Bergstrom y colaboradores, J. Am. Chem. Soc., 117: 1201 - 1209 (1995); Franchetti y colaboradores, Biorg. Med. Chem. Lett. 11: 67 - 69 (2001); y Nair y colaboradores, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 20(4 - 7): 735 - 738 (2001).

El difluorotolilo es una nucleobase no natural que funciona como una base universal. El difluorotolilo es un isómero de la nucleobase natural timina. Pero a diferencia de la timina, el difluorotolilo no muestra una selectividad apreciable por cualquiera de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funcionan como bases universales y que son susceptibles para la presente invención son 4-fluoro-6-metilbenzimidazol y 4-metilbenzimidazol. Además, los derivados de isocarboestirilo relativamente hidrofóbicos de 3-metil isocarboestirilo, 5-metil isocarboestirilo, y 3-metil-7-propinil isocarboestirilo son bases universales que provocan solamente una ligera desestabilización de los dúplexes de oligonucleótidos, en comparación con la secuencia del oligonucleótido que contiene solamente bases naturales. Otras nucleobases no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-

imidizopiridinilo, pirrolopiridinilo, isocarboestirilo, 7-propinil isocarboestirilo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetil-fenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenantraceno, pirenilo, estilbenilo, tetraceno, pentaceno, y los derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, incluyendo los procedimientos sintéticos, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, véase: Schweitzer y colaboradores, *J. Org. Chem.*, 59: 7238 - 7242 (1994); Berger y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 28(15): 2911 - 2914 (2000); Moran y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 2056 - 2057 (1997); Morales y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 2323 - 2324 (1999); Guckian y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8182-8183 (1996); Morales y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 122(6): 1001 - 1007 (2000); McMinn y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 11585 - 11586 (1999); Guckian y colaboradores, *J. Org. Chem.*, 63: 9652 - 9656 (1998); Moran y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 10506 - 10511 (1997); Das y colaboradores, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1: 197 - 206 (2002); Shibata y colaboradores, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1: 1605 - 1611 (2001); Wu y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 122(32): 7621 - 7632 (2000); O'Neill y colaboradores, *J. Org. Chem.*, 67: 5869 - 5875 (2002); Chaudhuri y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 10434 - 10442 (1995); y la Patente de los Estados Unidos No. 6.218.108.

#### 15 Transporte de agentes de ARNi dentro de las células

Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, la similitud química entre los agentes de ARNi conjugados con colesterol y ciertos constituyentes de las lipoproteínas (por ejemplo, colesterol, colesteril ésteres, fosfolípidos), puede conducir a la asociación de los agentes de ARNi con lipoproteínas (por ejemplo, LDL, HDL) en la sangre, y/o a la interacción del agente de ARNi con los componentes celulares que tienen afinidad por el colesterol, por ejemplo los componentes de la ruta de transporte de colesterol. Las lipoproteínas, así como sus constituyentes, son absorbidas y procesadas por las células mediante diferentes mecanismos de transporte activo y pasivo, por ejemplo, sin limitación, mediante endocitosis del LDL enlazado con el receptor de LDL, endocitosis de las LDL oxidadas o bien modificadas, a través de la interacción con el receptor depurador A, la absorción de colesterol HDL en el hígado mediada por el receptor depurador B1, pinocitosis, o transporte de colesterol a través de las membranas mediante las proteínas transportadoras de ABC (casete de enlazamiento de ATP), por ejemplo ABC-A1, ABC-G1 o ABC-G4. Por consiguiente, los agentes de ARNi conjugados con colesterol podrían disfrutar de una absorción facilitada por parte de las células que poseen estos mecanismos de transporte, por ejemplo las células del hígado. Como tal, la presente invención proporciona evidencia y métodos generales para dirigir agentes de ARNi hacia las células que expresan ciertos componentes de la superficie celular, por ejemplo receptores, mediante la conjugación de un ligando natural para tal componente (por ejemplo, colesterol) con el agente de ARNi, o mediante la conjugación de una fracción química (por ejemplo, colesterol) con el agente de ARNi que se asocia con, o que se enlaza con un ligando natural para el componente (por ejemplo, LDL, HDL).

#### Otras formas de realización

Un agente de ARNi, puede ser producido en una célula *in vivo*, por ejemplo, a partir de plantillas de ADN exógeno, que se suministran dentro de la célula. Por ejemplo, las plantillas de ADN se pueden insertar en los vectores, y se pueden utilizar como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden suministrar a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local (Patente de los Estados Unidos No. 5.328.470), o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91: 3054 - 3057, 1994). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir al vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en donde se incruste el vehículo de suministro génico. Las plantillas de ADN, por ejemplo, pueden incluir dos unidades de transcripción, una que produzca una transcripción que incluya la cadena superior de un agente de ARNi, y una que produzca una transcripción que incluya la cadena inferior de un agente de ARNi. Cuando se transcriben las plantillas, se produce el agente de ARNi, y se procesa en fragmentos de agente de ARNi corto que median el silenciamiento génico.

#### 45 Formulación

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen a los compuestos de ARN bc de la invención. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una cantidad de formas, dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico, y del área que se vaya a tratar. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante un nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica, y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo intratecal o intraventricular.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos, y polvos. Pueden ser necesarios o deseables los vehículos farmacéuticos convencionales, acuosos, en polvo, o bases oleosas, espesantes, y similares. También pueden ser útiles condones recubiertos, guantes, y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en donde los ARN bc están en mezcla con un agente de suministro tópico, tal como lípidos, liposomas,



5 ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes, y tensoactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen los neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina = DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina = DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), los negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol = DMPG), y los catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo = DOTAP, y dioleoilfosfatidil etanolamina = DOTMA), por ejemplo bromuro de (+/-)-N-(3-amino-propil)-N,N-dimetil-2,3-bis-(dodecilo)-1-propanamino = GAP-DLRIE). Los ARN bc de la invención se pueden encapsular dentro de liposomas, o pueden formar complejos con los mismos, en particular con los liposomas catiónicos. De una manera alternativa, los ARN bc pueden formar complejos con lípidos, en particular con los 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, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecil-azacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo de 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo, miristato de isopropilo, IPM), monoglicérido, diglicérido, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Las formulaciones tópicas se describen con detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con número de serie 09/315.298, presentada el 20 de mayo de 1999.

15 Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones, o soluciones en agua o en medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, pastillas, tabletas, o minitabledas. Pueden ser deseables los espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión, o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquéllas en donde los ARN bc se administran junto con uno o más potenciadores 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/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA), y ácido ursodesoxiquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshidrocólico, 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, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, de sodio). También se prefieren las combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplo ácidos grasos / sales en combinación con ácidos biliares / sales. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica del ácido láurico, del ácido caprílico, y UDCA. Otros potenciadores de penetración incluyen lauril éter de polioxietileno-9, cetil éter de polioxietileno-20. Los ARN bc se pueden suministrar en forma oral, en una forma granular, incluyendo las partículas secadas por pulverización, o pueden formar complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes formadores de complejos de ARN bc incluyen los 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. Los agentes formadores de complejos particularmente preferidos incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina, y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para ARN bc y su preparación se describen con detalle en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos con serial No. 08/886.829 (presentada el 1 de julio de 1997), con serial No. 09/108.673 (presentada el 1 de julio de 1998), con serial No. 09/256.515 (presentada el 23 de febrero de 1999), con serial No. 09/082.624 (presentada el 21 de mayo de 1998), y con serial No. 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999).

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal, o intraventricular, pueden incluir soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener reguladores del pH, diluyentes, y otros aditivos adecuados, tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de penetración, compuestos portadores, y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

55 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, las cuales convenientemente se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con las técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima a los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, se le da forma al producto.

Las composiciones se pueden formular en cualquiera de muchas posibles formas de dosificación, tales como, pero

sin limitarse a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios, y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos, o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y utilizar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitarse a, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas, y liposomas. Aunque son básicamente de una naturaleza similar, estas formulaciones varían en los componentes y en la consistencia del producto final. La preparación de estas composiciones y formulaciones es en general conocida por los expertos en la técnica farmacéutica 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 típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de gotas que normalmente exceden a un diámetro de 0,1  $\mu\text{m}$  (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 2, página 335; Higuchi y colaboradores, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 301). Las emulsiones son con frecuencia sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersadas una en la otra. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad de agua en aceite (a/ac) o de aceite en agua (ac/a). Cuando una fase acuosa se divide finamente y se dispersa como gotas diminutas en una fase oleosa en mayor volumen, la composición resultante se denomina como una emulsión de agua en aceite (a/ac). De una manera alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa como gotas diminutas en una fase acuosa en mayor volumen, la composición resultante se denomina como una emulsión de aceite en agua (ac/a). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución ya sea en la fase acuosa, la fase oleosa, o por sí mismo como una fase separada. También pueden estar presentes excipientes farmacéuticos, tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes, y antioxidantes en las emulsiones, según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que cuenten con más de dos fases, tales como, por ejemplo, en el caso de las emulsiones de aceite en agua en aceite (ac/a/ac) y de agua en aceite en agua (a/ac/a). Estas formulaciones complejas con frecuencia proporcionan ciertas ventajas que no proporcionan las emulsiones binarias simples. Las emulsiones múltiples en donde las gotitas de aceite individuales de una emulsión de aceite en agua encierran a las pequeñas gotitas de agua, constituyen una emulsión de agua/aceite/agua. De la misma forma, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa, proporciona una emulsión de aceite/agua/aceite.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Con frecuencia, la fase dispersada o discontinua de la emulsión se dispersa bien en la fase externa o continua, y se mantiene en esta forma a través del medio de los emulsionantes o de la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las bases de ungüentos y cremas estilo emulsión. Otros medios para estabilizar las emulsiones implican el uso de emulsionantes, que se pueden incorporar en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en forma amplia en cuatro categorías: tensoactivos sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción, y sólidos finamente dispersados (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 199).

Los tensoactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones, y han sido revisados en la literatura (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., 1988, Volumen 1, página 199). Los tensoactivos son típicamente anfífilicos, y comprenden una porción hidrofílica y una porción hidrófoba. La proporción de la naturaleza hidrofílica con respecto a la hidrófoba del tensoactivo se ha denominado como el equilibrio hidrofílico/lipofílico (HLB), y es una valiosa herramienta en la categorización y selección de los tensoactivos en la preparación de formulaciones. Los tensoactivos se pueden clasificar en diferentes clases con base en la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónicos, aniónicos, catiónicos, y anfotéricos (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 285).

Los emulsionantes de origen natural utilizados en las formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina, y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas tales que pueden absorber

agua para formar emulsiones de agua en aceite y todavía retener sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrofílica. También se han utilizado sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, especialmente en combinación con tensoactivos y en preparaciones viscosas. Éstos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan, tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal, y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos, y sólidos no polares, tales como carbono o triestearato de glicerilo.

También se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes en las formulaciones en emulsión, y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Éstos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes, y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 199).

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

Debido a que las emulsiones con frecuencia contienen una cantidad de ingredientes, tales como carbohidratos, proteínas, esteroides, y fosfatidos, que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones con frecuencia incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente utilizados incluidos en las formulaciones en 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 las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes utilizados pueden ser depuradores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores, tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas de antioxidantes, tales como ácido cítrico, ácido tartárico, y lecitina.

La aplicación de las formulaciones en emulsión por medio de las vías dermatológica, oral, y parenteral, y los métodos para su fabricación, se han revisado en la literatura (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 199). Las formulaciones en emulsión para suministro oral se han utilizado muy ampliamente, debido a su facilidad de formulación, así como a la eficacia desde el punto de vista de la absorción y la biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 199). Los laxantes con base en aceite mineral, las vitaminas solubles en aceite, y las preparaciones nutritivas altas en grasas, están entre los materiales que se han administrado comúnmente de forma oral como emulsiones de aceite en agua.

En una forma de realización, las composiciones de los ARN bc y ácidos nucleicos, se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite, y anfífilo, que es una sola solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un aceite en una solución tensoactiva acuosa, y luego se agrega una cantidad suficiente de un cuarto componente, en general un alcohol de una longitud de cadena intermedia, para formar un sistema transparente. Por consiguiente, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas de actividad superficial (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Editor, 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185 - 215). Las microemulsiones comúnmente se preparan mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensoactivo, cotensoactivo, y electrolito. El que la microemulsión sea del tipo de agua en aceite (a/ac) o de aceite en agua (ac/a) depende de las propiedades del aceite y del tensoactivo utilizados, y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y de las colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensoactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing .Co., Easton, Pa., 1985, página 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fases se ha estudiado extensamente, y ha producido un conocimiento exhaustivo, para un experto en la materia, de la manera en la que se formulan las microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 335). Comparando con las emulsiones

convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar los fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman de una manera espontánea.

Los tensoactivos utilizados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos iónicos, tensoactivos no iónicos, Brij 96, oleil éteres de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquiolato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), 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 mediante su penetración en la película del tensoactivo, y en consecuencia, para crear una película desordenada debido al espacio vacío entre las moléculas del tensoactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de cotensoactivos, y en la técnica se conocen sistemas en microemulsión auto-emulsionantes exentas de alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no se limita a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, polietilenglicoles, y derivados de etilén glicol. La fase oleosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di, y triglicéridos de cadena mediana (de 8 a 12 átomos de carbono), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos de 8 a 10 átomos de carbono poliglicolizados saturados, aceites vegetales, y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente interesantes desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y de la mejor absorción de los fármacos. Las microemulsiones con base en lípido (tanto de aceite en agua como de agua en aceite) han sido propuestas para mejorar la biodisponibilidad oral de los fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides y colaboradores, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385 - 1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones tienen la ventaja de una mejor solubilización del fármaco, protección del fármaco de la hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción del fármaco debido a las alteraciones inducidas por el tensoactivo en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre las formas de dosificación sólidas, mejor potencia clínica, y toxicidad reducida (Constantinides y colaboradores, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho y colaboradores, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138 - 143). Con frecuencia las microemulsiones pueden formarse de una manera espontánea cuando se juntan sus componentes a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente conveniente cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos, o los ARN bc. Las microemulsiones también han sido efectivas en el suministro transdérmico de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones en microemulsión faciliten la mayor absorción sistémica de los ARN bc y de los ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal, así como que mejoren la absorción celular local de los ARN bc y de los ácidos nucleicos dentro del tracto gastrointestinal, la vagina, la cavidad bucal, y otras áreas de administración.

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

#### Liposomas

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

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

Con el objeto de cruzar la piel intacta del mamífero, las vesículas de lípido deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por consiguiente, es deseable utilizar un liposoma que sea altamente deformable, y que sea capaz de pasar a través de estos poros tan finos.

Las ventajas adicionales de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son

5 biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio rango de fármacos solubles en agua y en lipido; los liposomas pueden proteger a los fármacos encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Editores), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, página 245). Las consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial de lípido, el tamaño de vesícula, y el volumen acuoso de los liposomas.

10 Los liposomas son útiles para la transferencia y suministro de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas empiezan a fusionarse con las membranas celulares, y a medida que progresa la fusión del liposoma y la célula, se vacía el contenido liposomal al interior de la célula, en donde puede actuar el agente activo.

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

20 Varios reportes han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes, incluyendo ADN de alto peso molecular, a la piel. Los compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas, y los ADN de alto peso molecular, han sido administrados a la piel. La mayoría de las aplicaciones dieron como resultado el direccionamiento a la epidermis superior.

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

30 Los liposomas que son sensibles al pH, o que están negativamente cargados, atrapan el ADN en lugar de formar un complejo con él. Debido a que tanto el ADN como el lípido están similarmente cargados, se presenta el rechazo en lugar de la formación de complejo. No obstante, algo de ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han utilizado para suministrar ADN que codifica el gen de la timidina quinasa a las monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen endógeno se detectó en las células objetivo (Zhou y colaboradores, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269 - 274).

35 Un tipo importante de composición liposomal incluye fosfolípidos diferentes de la fosfatidilcolina derivada en forma natural. Las composiciones de liposomas neutras, por ejemplo, se pueden formar a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), o de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman a partir de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman primordialmente a partir de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposomal se forma a partir de fosfatidilcolina (PC), tal como, por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

40 Varios estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones de fármacos liposomales a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a la piel del cobayo, dieron como resultado una reducción de las llagas provocadas por herpes de la piel, mientras que el suministro de interferón por otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) fue inefectivo (Weiner y colaboradores, *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405 - 410). Además, un estudio adicional probó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal, en comparación con la administración de interferón utilizando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal fue superior a la administración acuosa (du Plessis y colaboradores, *Antiviral Research*, 1992, 18, 259 - 265).

50 También se han examinado los sistemas liposomales no iónicos para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular los sistemas que contienen tensoactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposomales no iónicas que contienen Novasome™ I (dilaurato de glicerilo / colesterol / estearil éter de polioxietileno-10), y Novasome™ II (diestearato de glicerilo / colesterol / estearil éter de polioxietileno-10), se usaron para suministrar ciclosporina A a la dermis de la piel del ratón. Los resultados indicaron que estos sistemas liposomales no iónicos fueron efectivos para facilitar el depósito de ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu y colaboradores, *S. T. P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

55 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se utiliza en la presente invención, se refiere a los liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se

incorporan en liposomas, dan como resultado mejores tiempos de vida en la circulación en relación con los liposomas que carecen de estos lípidos especializados. Los ejemplos de los liposomas estéricamente estabilizados son aquéllos en donde parte de la porción de lípido que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido  $G_m1$ , o (B) forma un derivado con uno o más polímeros hidrofílicos, tales como una fracción de polietilén glicol (PEG). Aunque sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, se piensa en la técnica que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomiélinea, o lípidos derivados de PEG, la mejor vida media en circulación de estos liposomas estéricamente estabilizados se deriva de una absorción reducida en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen y colaboradores, FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu y colaboradores, Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Se conocen en el estado del arte diferentes liposomas que contienen uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos y colaboradores (Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) reportaron la capacidad del monosialogangliósido  $G_m1$ , el sulfato de galactocerebrosido y fosfatidilinositol, para mejorar las vidas medias en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon y colaboradores, (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 1988, 85, 6949). La Patente de los Estados Unidos No. 4.837.028 y la Publicación Internacional No. WO 88/04924, ambas de Allen y colaboradores, dan a conocer liposomas que comprenden (1) esfingomiélinea, y (2) el gangliósido  $G_m1$  o un éster de sulfato de galactocerebrosida. La Patente de los Estados Unidos No. 5.543.152 (Webb y colaboradores) da a conocer liposomas que contienen esfingomiélinea. Los liposomas que contienen 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se dan a conocer en la Publicación Internacional No. WO 97/13499 (Lim y colaboradores).

Muchos liposomas que comprenden lípidos que forman derivados con uno o más polímeros hidrofílicos, y los métodos para su preparación, se conocen en el arte. Sunamoto y colaboradores (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico,  $2C_{121543}$ , que contiene una fracción de PEG. Illum y colaboradores (FEBS Lett., 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrofílico de las partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado vidas medias en sangre significativamente mejoradas. Los fosfolípidos sintéticos modificados mediante la unión de grupos carboxílicos de polialquilén glicoles (por ejemplo, PEG) son descritos por Sears (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.426.330 y 4.534.899). Klivanov y colaboradores (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidil etanolamina (PE) que forman derivados con PEG o con estearato de PEG, tienen incrementos significativos en las vidas medias en la circulación sanguínea. Blume y colaboradores (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron estas observaciones hasta otros fosfolípidos derivados de PEG, por ejemplo DSPE-PEG, formado a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen fracciones de PEG covalentemente enlazadas sobre su superficie externa se describen en la Patente Europea No. EP 0 445 131 B1 y en la Publicación Internacional No. WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen del 1 al 20% en moles de PE que forma derivado con PEG, y los métodos para su utilización, son descritas por Woodle y colaboradores (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.013.556 y 5.356.633) y Martin y colaboradores (Patente de los Estados Unidos No. 5.213.801 y Patente Europea No. EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden una cantidad de otros conjugados de lípido-polímero se dan a conocer en la Publicación Internacional No. WO 91/05545 y en la Patente de los Estados Unidos No. 5.225.212 (ambas de Martin y colaboradores), y en la Publicación internacional No. WO 94/20073 (Zalipsky y colaboradores). Los liposomas que contienen lípidos de ceramida modificados por PEG se describen en la Publicación Internacional No. WO 96/10391 (Choi y colaboradores). La Patente de los Estados Unidos No. 5.540.935 (Miyazaki y colaboradores) y la Patente de los Estados Unidos No. 5.556.948 (Tagawa y colaboradores) describen liposomas que contienen PEG, que se pueden formar derivados adicionalmente con fracciones funcionales sobre sus superficies.

En la técnica se conoce un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. La Publicación Internacional No. WO 96/40062 a Thierry y colaboradores, da a conocer métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente de los Estados Unidos No. 5.264.221 de Tagawa y colaboradores, da a conocer liposomas enlazados con proteínas, y asevera que el contenido de estos liposomas puede incluir ARN bc. La Patente de los Estados Unidos No. 5.665.710 de Rahman y colaboradores, describe ciertos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. La Publicación internacional No. WO 97/04787 de Love y colaboradores, da a conocer liposomas que comprenden ARN bc dirigidos al gen raf.

Los transfersomas son incluso otro tipo de liposomas, y son agregados de lípido altamente deformables que son candidatos atractivos para los vehículos de suministro de fármacos. Los transfersomas se pueden describir como gotitas de lípido que son tan altamente deformables que son fácilmente capaces de penetrar a través de los poros que sean más pequeños que la gotita. Los transfersomas se pueden adaptar al medio ambiente en el que se utilicen, por ejemplo, son auto-optimizantes (adaptables a la forma de los poros de la piel), auto-reparadores, con frecuencia alcanzan sus objetivos sin fragmentación, y con frecuencia se auto-cargan. Para elaborar los transfersomas, es posible agregar activadores del borde de la superficie, usualmente tensoactivos, a una composición liposomal estándar. Los transfersomas se han utilizado para suministrar albúmina de suero a la piel. El suministro de albúmina de suero mediado por transfersomas ha demostrado ser tan efectivo como la inyección subcutánea de una solución que contenga albúmina de suero.

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

10 Si la molécula de tensoactivo no está ionizada, se clasifica como un tensoactivo no iónico. Los tensoactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en los productos farmacéuticos y cosméticos, y son útiles sobre un amplio rango de valores de pH. En general, sus valores de HLB están en el intervalo desde 2 hasta aproximadamente 18, dependiendo de su estructura. Los tensoactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos, tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y los éteres no iónicos, tales como etoxilatos de alcohol graso, alcoholes propoxilados, y copolímeros en bloque etoxilados/propoxilados, también se incluyen en esta clase. Los tensoactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensoactivos no iónicos.

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

Si la molécula de tensoactivo lleva una carga positiva cuando se disuelve o se 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 de esta clase.

25 Si la molécula de tensoactivo tiene la capacidad para portar ya sea una carga positiva o negativa, el tensoactivo se clasifica como anfotérico. Los tensoactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquil-amidas sustituidas, N-alquil-betainas, y fosfátidos.

El uso de tensoactivos en productos farmacológicos, formulaciones, y en emulsiones, ha sido revisado (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., 1988, página 285).

#### Potenciadores de penetración

30 En una forma de realización, la presente invención emplea diferentes potenciadores de penetración para efectuar el suministro eficiente de ácidos nucleicos, en particular ARN bc, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución tanto en la forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, usualmente sólo los fármacos solubles en lípido o lipofílicos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que inclusive los fármacos no lipofílicos pueden cruzar las membranas celulares, si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de penetración. Además, para ayudar a la difusión de los fármacos no lipofílicos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipofílicos.

40 Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensoactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no tensoactivos no quelantes (Lee y colaboradores, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada una de las clases anteriormente mencionadas de potenciadores de penetración se describen a continuación con mayor detalle.

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

50 Ácidos grasos: Diferentes ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido estearico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, mono-oleína (1-mono-oleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo de 1 a 10 átomos de carbono de las mismas (por ejemplo, metilo, isopropilo, y terbutilo), y mono y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato,

linoleato, etc.) (Lee y colaboradores, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 - 33; E1 Hariri y colaboradores, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651 - 654).

5 Sales biliares: El papel fisiológico de la bilis incluye facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (Brunton, Capítulo 38, en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9na Edición, Hardman y colaboradores, Editores, McGraw-Hill, Nueva York, 1996, páginas 934 - 935). Diferentes sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Por consiguiente, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes de la bilis, así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal sódica farmacéuticamente aceptable, colato de sodio),  
10 ácido deshdrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio, y lauriléter de polioxietileno-9 (POE) (Lee y colaboradores, *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39, en: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ava Edición, Gennaro, editor, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782 - 783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 - 33; Yamamoto y colaboradores, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita y colaboradores, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579 - 583).

20 Agentes quelantes: Los agentes quelantes, pueden definirse como compuestos que remueven los iones metálicos de la solución, mediante la formación de complejos con los mismos, con el resultado de que se mejora la absorción de los ARN bc a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de penetración, los agentes quelantes tienen la ventaja adicional de servir también como inhibidores de ADNasa, debido a que la mayoría de las nucleasas de ADN caracterizadas requieren de un ión metálico divalente para la catálisis, y son por lo tanto, inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogn*, 1993, 618, 315 - 339). Los agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminatetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato, y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, laurith-9, y derivados de N-aminoacilo de las beta-dicetonas (enaminas) (Lee y colaboradores, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 - 33; Buur y colaboradores, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43 - 51).

30 No tensoactivos no quelantes: Como se utiliza en la presente invención, los compuestos potenciadores de penetración no tensoactivos no quelantes se pueden definir como los compuestos que demuestran una actividad insignificante como agentes quelantes o como tensoactivos, pero que no obstante, mejoran la absorción de los ARN bc a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 - 33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenilazacicloalcanona (Lee y colaboradores, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes anti-inflamatorios no esteroideos, tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita y colaboradores, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621 - 626).

40 Los agentes que mejoran la absorción de los ARN bc al nivel celular, también se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas y a otras composiciones. Por ejemplo, también se sabe que los lípidos catiónicos, tales como lipofectina (Junichi y colaboradores, Patente de los Estados Unidos No. 5.705.188), los derivados de glicerol catiónicos, y las moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo y colaboradores, Solicitud PCT No. WO 97/30731), y otros péptidos, mejoran la absorción celular de los ARN bc.

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

#### Portadores

50 Ciertas composiciones también incorporan compuestos portadores en la formulación. Como se utiliza en la presente invención, "compuesto portador" o "portador" puede referirse a un ácido nucleico o análogo del mismo, que sea inerte (es decir, no posee actividad biológica por sí mismo), pero que es reconocido como un ácido nucleico por los procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tenga actividad biológica, por ejemplo, mediante la degradación del ácido nucleico biológicamente activo, o promoviendo su remoción de la circulación. La co-administración de un ácido nucleico y un compuesto portador, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón, u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto portador y el  
55 ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARN bc parcialmente de fosforotioato en el tejido hepático, se puede reducir cuando se co-administra con ácido poli-inosínico, sulfato de dextrano, ácido policítidico, o ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilben-2,2'-disulfónico (Miyao y colaboradores, *Antisense Res. Dev.*,



1995, 5, 115 - 121; Takakura y colaboradores, *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177 - 183.

#### Excipientes

5 En contraste con un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un solvente, agente de suspensión, o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte, farmacéuticamente aceptable, para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido, y se selecciona, teniendo en mente la planeación de la administración, para proporcionar el volumen, consistencia, etc., deseados, cuando se combine con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los portadores farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz previamente gelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil-celulosa, poliacrilatos, o fosfato ácido de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

15 Los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral, que no reaccionan perjudicialmente con los ácidos nucleicos, también se pueden utilizar para formular las composiciones. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetil-celulosa, polivinil-pirrolidona y similares.

20 Las formulaciones para administración tópica de los ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener reguladores del pH, diluyentes, y otros aditivos adecuados. Se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral, que no reaccionen perjudicialmente con los ácidos nucleicos.

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

#### Composiciones farmacéuticas para el suministro al tracto respiratorio

30 Otro aspecto proporciona el suministro de agentes de ARNi al tracto respiratorio, en particular para el tratamiento de fibrosis quística. El tracto respiratorio incluye las vías respiratorias superiores, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguidas por las vías respiratorias inferiores, las cuales incluyen la tráquea, seguida por las bifurcaciones en los bronquios y los bronquiolos. Las vías respiratorias superiores e inferiores se denominan como las vías respiratorias conductoras. Los bronquiolos terminales se dividen entonces en los bronquiolos respiratorios, que luego conducen hasta la zona respiratoria final, los alvéolos, o el pulmón profundo. El epitelio de las vías respiratorias conductoras es el objetivo primario de los aerosoles terapéuticos inhalados, para el suministro de los agentes de ARNi, tales como los agentes de alfa-ENaC por medio de ARNi.

40 Las composiciones de suministro pulmonar se pueden suministrar mediante inhalación por el paciente, de una dispersión, de tal manera que la composición, preferiblemente el agente de ARNi, dentro de la dispersión, pueda alcanzar al pulmón en donde puede, por ejemplo, ser fácilmente absorbida a través de la región alveolar directamente dentro de la circulación sanguínea. El suministro pulmonar puede ser efectivo tanto por suministro sistémico como por suministro localizado con el fin de tratar enfermedades de los pulmones.

45 El suministro pulmonar se puede lograr mediante diferentes enfoques, incluyendo el uso de formulaciones nebulizadas, en aerosol, micelares, 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 basados en aerosol, y dispositivos de dispersión de polvo seco. Se prefieren los dispositivos dosificadores. Uno de los beneficios de utilizar un atomizador o inhalador, es que se minimiza el potencial de contaminación, debido a que los dispositivos están auto-contenidos. Los dispositivos de dispersión de polvo seco, por ejemplo, suministran los fármacos que pueden ser fácilmente formulados como polvos secos. Una composición de ARNi se puede almacenar en forma estable como polvos liofilizados o secados por pulverización por sí mismos, o en combinación con portadores adecuados en polvo. El suministro de una composición para inhalación puede ser mediada por un elemento de tiempo de dosificación, el cual puede incluir un cronómetro, un contador de dosis, un dispositivo medidor de tiempo, o un indicador de tiempo que, cuando se incorpora en el dispositivo, hace posible el rastreo de la dosis, el monitoreo del cumplimiento y/o el disparo de la dosis a un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

Los ejemplos de los dispositivos farmacéuticos para suministro en aerosol incluyen inhaladores dosificadores (MDI), inhaladores de polvo seco (DPI), y nebulizadores de chorro de aire. Los ejemplos de sistemas de suministro mediante inhalación que se pueden adaptar fácilmente para el suministro de los agentes de ARN objetivo se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.756.353 y 5.858.784; y en las Solicitudes del PCT No. WO 98/31346; WO 98/10796; WO 00/27359; WO 01/54664; WO 02/060412. Otras formulaciones en aerosol que se pueden utilizar para suministrar los agentes de ARNi se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.294.153; 6.344.194; 6.071.497, y en las Solicitudes PCT Nos. WO 02/066078; WO 02/053190; WO 01/60420; WO 00/66206. Además, los métodos para suministrar los agentes de ARN se pueden adaptar a partir de aquéllos empleados en el suministro de otros oligonucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) mediante inhalación, tal como se describe en Templin y colaboradores, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, 10: 359 - 68; Sandrasagra y colaboradores, *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1: 979 - 83; Sandrasagra y colaboradores, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12: 177 - 81.

El suministro de los agentes también puede involucrar la administración de los denominados "pro-fármacos", es decir, formulaciones o modificaciones químicas de una sustancia terapéutica que requiera de alguna forma de procesamiento o transporte mediante los sistemas innatos del organismo sujeto para liberar la sustancia terapéutica, preferiblemente en el sitio en donde se desee su acción; ésta última forma de realización se puede utilizar junto con el suministro al tracto respiratorio, pero también junto con otras formas de realización de la presente divulgación. Por ejemplo, los pulmones humanos pueden remover o degradar rápidamente los aerosoles depositados hidrolíticamente disociables durante períodos en el intervalo desde minutos hasta horas. En las vías respiratorias superiores, el epitelio ciliado contribuye al "excalador mucociliar", mediante el cual las partículas son barridas de las vías respiratorias hacia la boca. Pavia, D., "Lung Mucociliary Clearance", en *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S. W. y Pavia, II, Editores, Butterworths, Londres, 1984. En los pulmones profundos, los macrófagos alveolares son capaces de fagocitosar las partículas tan pronto se depositan. Warheit y colaboradores, *Microscopy Res. Tech.*, 26: 412 - 422 (1993); y Brain, J. D., "Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages", en *The Reticuloendothelial System*, S. M. Reichard y J. Filkins, Editores, Plenum, Nueva York, páginas 315 - 327, 1985.

En formas de realización preferidas, en particular en donde se desee una dosificación sistémica con el agente de ARNi, los agentes de ARNi en aerosol se formulan como micropartículas. Las micropartículas que tienen un diámetro de entre 0,5 y 10 micras, pueden penetrar los pulmones, pasando a través de la mayoría de las barreras naturales. Se requiere un diámetro de menos de 10 micras para evitar la garganta; se requiere un diámetro de 0,5 micras o más para evitar ser exhaladas.

#### Otros componentes

Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares convencionalmente encontrados en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales, tales como, por ejemplo, antipiréticos, astringentes, anestésicos locales, o agentes anti-inflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diferentes formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes, y estabilizantes. Sin embargo, estos materiales, cuando se añaden no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones. Las formulaciones se pueden esterilizar, y si se desea se pueden mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, reguladores del pH, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interactúen de una manera perjudicial con el(los) ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

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

Ciertas formas de realización proporcionan combinaciones farmacéuticas y composiciones que contienen: (a) uno o más agentes de ARN bc, y (b) uno o más agentes terapéuticos diferentes que funcionen mediante un mecanismo de interferencia que no sea de ARN.

De conformidad con lo anterior, la invención incluye una combinación de un ARNi con una sustancia farmacológica anti-inflamatoria, broncodilatadora, anti-histamínica, anti-tusiva, antibiótica, o de ADNasa, estando dicho bloqueador del canal de sodio epitelial y dicha sustancia farmacológica en la misma o en diferente composición farmacéutica.

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

Las sustancias farmacológicas adecuadas de ADNasa incluyen dornasa alfa (Pulmozyme™), una solución altamente

purificada de desoxiribonucleasa I humana recombinante (rhADNasa), que disocia selectivamente el ADN. La dornasa alfa se utiliza para tratar fibrosis quística.

5 Otras combinaciones útiles de bloqueadores del canal de sodio epitelial con fármacos anti-inflamatorios, son aquéllas con antagonistas de los receptores de quimiocina, por ejemplo, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9, y CCR-10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, particularmente antagonistas de CCR-5, tales como antagonistas de Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; los antagonistas Takeda, tales 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 de CCR-5 descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6.166.037 (particularmente en las reivindicaciones 18 y 19), en la Publicación internacional No. WO 00/66558 (particularmente en la reivindicación 8), en la Publicación internacional No. WO 00/66559 (en particular en la reivindicación 9), en la Publicación internacional No. WO 04/018425, y en la Publicación internacional No. WO 04/026873.

15 Los fármacos anti-inflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular glucocorticosteroides, tales como budesonida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, ciclesonida, o furoato de mometasona, o los esteroides descritos en las Publicaciones Internacionales Nos. WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (especialmente aquéllos de los Ejemplos 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 y 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 y WO 04/66920; agonistas del receptor glucocorticoide no esteroideos, tales como aquéllos descritos en el documento DE 10261874, en las Publicaciones internacionales Nos. 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 de LTD4, tales como montelukast y zafirlukast; inhibidores de PDE4, tales como cilomilast (Ariflo® GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659/PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SeICID(TM) CC-10004 (Celgene), VM5541UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y aquéllos que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Nos. WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 y WO 04/037805; antagonistas del receptor de adenosina A2B, tales como los descritos en la Publicación internacional WO 02/42298; y agonistas del adrenoceptor beta-2, tales como albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol, fenoterol, procaterol, y especialmente, formoterol, carmoterol, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y los compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de Fórmula (I) de la Publicación internacional WO 00/75114, preferiblemente los compuestos de los ejemplos de la misma, en especial indacaterol y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, así como los compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de la Fórmula (I) de la Publicación internacional WO 04/16601, y también los compuestos de los documentos EP 1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, USP 200210055651, 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.

45 Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio y CHF 4226 (Chiesi), y glicopirrolato, pero también los que se describen en os 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 al antagonistas del adrenoceptor beta-2/antagonistas muscarínicos, tales como aquellos divulgados en los documentos USP 2004/0167167, WO 04/74246 y WO 04/74812.

50 Las sustanciasarmacológicas anti-histamínicas adecuadas incluyen clorhidrato de cetirizina, acetaminofen, fumarato de clemastina, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina, y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, evastina, epinastina, mizolastina y tefenadina, así como los que se dan a conocer en los documentos JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

55 Otras combinaciones útiles de agentes con fármacos anti-inflamatorios son aquéllas con antagonistas de receptores de quimiocina, por ejemplo, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, particularmente los antagonistas de CCR-5 tales como los antagonistas Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D; los antagonistas Takeda, tales 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 los antagonistas de CCR-S descritos en la Patente de los Estados Unidos No. USP 6.166.037

(en particular en las reivindicaciones 18 y 19), en la Publicación internacional WO 00/66558 (en particular en la reivindicación 8), en la Publicación internacional WO 00/66559 (en particular en la reivindicación 9), y en las Publicaciones Internacionales WO 04/018425 y WO 04/026873.

5 Otros agentes terapéuticos adicionales útiles también se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en las moléculas enlazadoras de citoquina, particularmente anticuerpos de otras citoquinas, en particular una combinación con un anticuerpo anti-IL4, tal como se describe en el documento PCT Número PCT/EP2005/00836, un anticuerpo anti-IgE, tal como Xolair®, un anticuerpo anti-IL31, un anticuerpo anti-IL31R, un anticuerpo anti-TSLP, un anticuerpo receptor anti-TSLP, un anticuerpo anti-endoglina, un anticuerpo anti-IL1b, o un anticuerpo anti-IL13, tal como se describen en la Publicación internacional WO 05/007699.

10 Se pueden utilizar dos o más compuestos combinados juntos en una sola formulación, en forma separada, en forma concomitante o en forma secuencial.

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

20 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y de los estudios con animales, se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de las composiciones de la invención está generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante del compuesto, o, cuando sea apropiado, del producto de polipéptido de una secuencia objetivo (por ejemplo, para alcanzar una concentración reducida del polipéptido) que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logre una inhibición media-máxima de los síntomas), como se determina en cultivo celular. Esta información se puede utilizar para determinar más precisamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

25 Además a su administración individualmente o como una pluralidad, como se discutió anteriormente, los ARN bc se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos efectivos en el tratamiento de trastornos relacionados con ENaC. En cualquier caso, el médico que administre puede ajustar la cantidad y el tiempo de administración del ARN bc con base en los resultados observados utilizando medidas de eficacia estándar conocidas en la técnica o descritas en la presente invención.

#### Métodos de tratamiento y vías de suministro

35 Una composición que incluya un agente de ARNi, por ejemplo un agente de ARNi que se dirija al alfa-ENaC, se puede suministrar a un sujeto mediante una variedad de vías para alcanzar el suministro local en el sitio de acción, o para el suministro sistémico al sujeto. Los ejemplos de vías incluyen la administración local directa en el sitio de tratamiento, tal como en los pulmones o en el pasaje nasal, así como el suministro intravenoso, nasal, oral y ocular. Los medios preferidos para administrar los agentes de ARNi son a través de la administración directa a los pulmones y al pasaje nasal como una solución líquida, en aerosol o nebulizada.

Las formulaciones para inhalación o para administración parenteral son bien conocidas en el arte. Esta formulación puede incluir soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener reguladores del pH, diluyentes y otros aditivos adecuados. Para uso intravenoso, la concentración total de los solutos debe controlarse para hacer que la preparación sea isotónica.

45 Los compuestos activos dados a conocer en la presente invención, preferiblemente se administran a el(los) pulmon(es) o al pasaje nasal de un sujeto por cualquier medio apropiado. Los compuestos activos se pueden administrar mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables que contienen el compuesto activo o los compuestos activos, los cuales son inhalados por el sujeto. El compuesto activo puede formar un aerosol en una variedad de formas, tales como, pero sin limitarse a, inhalantes de polvo seco, inhaladores con dosificador o suspensiones líquido/líquido. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas opcionalmente pueden contener otros ingredientes terapéuticos, tales como amilorida, benzamil o fenamil, con el compuesto seleccionado incluido, en una cantidad efectiva para inhibir la reabsorción de agua desde las secreciones mucosas de las vías respiratorias, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4.501.729.

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

- 5 Las partículas abarcadas por el compuesto activo deben incluir partículas de un tamaño respirable, es decir, partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la boca o la nariz y la laringe después de su inhalación y en los bronquios y los alvéolos de los pulmones. En general, las partículas en el intervalo de tamaños de aproximadamente 1 a 10 micras (más particularmente, de un tamaño menor de aproximadamente 5 micras) son respirables. Las partículas de un tamaño no respirable que se incluyan en el aerosol, tienden a depositarse en la garganta y a ser tragadas, y la cantidad de partículas no respirables en el aerosol de preferencia se minimiza. Para la administración nasal, se prefiere un tamaño de partículas en el intervalo de 10 a 500 micras, para asegurar la retención en la cavidad nasal.

- 15 Las composiciones farmacéuticas líquidas del compuesto activo para producir un aerosol se pueden preparar mediante la combinación del compuesto activo con un vehículo adecuado, tal como agua estéril libre de pirógenos. Las soluciones salinas hipertónicas utilizadas son preferiblemente soluciones estériles libres de pirógenos, que comprenden del 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.

- 20 Los aerosoles de partículas líquidas que comprendan al compuesto activo, se pueden producir por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador a chorro a presión o un nebulizador ultrasónico. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una niebla de aerosol terapéutica, ya sea por medio de aceleración de gas comprimido, típicamente aire u oxígeno, a través de un orificio venturi angosto, o por medio de agitación ultrasónica.

- 25 Las formulaciones adecuadas para utilizarse en los nebulizadores consisten del ingrediente activo en un portador líquido, comprendiendo el ingrediente activo hasta el 40% p/p de la formulación, pero preferiblemente menos del 20% p/p. El portador es típicamente agua (y más preferiblemente agua estéril libre de pirógenos) o una solución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente hecha isotónica, pero puede ser hipertónica con los fluidos corporales mediante la adición, por ejemplo, de cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se hace estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes saborizantes, aceites volátiles, agentes reguladores del pH y tensoactivos.

- 35 De la misma manera, los aerosoles de partículas sólidas que comprenden al compuesto activo, se pueden producir con cualquier generador de aerosol terapéutico de partículas sólidas. Los generadores de aerosol para administrar compuestos terapéuticos sólidos en partículas a un sujeto, producen partículas que son respirables y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida previamente determinada de un producto terapéutico, en una proporción adecuada para la administración a seres humanos. Un tipo ilustrativo de un generador de aerosol de partículas sólidas es un insuflador. Las formulaciones adecuadas para administración mediante insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden suministrarse por medio de un insuflador o que pueden llevarse hasta la cavidad nasal en forma de un aspirado. En el insuflador, el polvo (por ejemplo, una dosis medida del mismo efectiva para llevar a cabo los tratamientos descritos en la presente invención) está contenido en cápsulas o cartuchos, típicamente hechas de gelatina o de plástico, que se perforan o se abren in situ, y se suministra el polvo mediante el aire aspirado a través del dispositivo después de la inhalación o por medio de una bomba operada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste ya sea exclusivamente del ingrediente activo o bien en una mezcla en polvo que comprenda al ingrediente activo, un diluyente de polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensoactivo opcional. El ingrediente activo típicamente comprende de 0,1 a 100% p/p de la formulación.

- 45 Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo comprende un inhalador o dosificador. Los inhaladores con dosificador son dispensadores en aerosol presurizados, que contienen típicamente una formulación en suspensión o en solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante su uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido, típicamente de 10 a 200 microlitros, para producir un aerosol en partículas finas que contiene al ingrediente activo. Los propelentes 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-solventes, por ejemplo, etanol, tensoactivos, tales como ácido oleico, o trioleato de sorbitán, agentes antioxidantes y saborizantes adecuados.

- 55 Se puede incorporar un agente de ARNi en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una o más especies de un agente de ARNi, y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente invención, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes

antibacterianos y contra hongos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de estos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el arte. Excepto en la medida en que el medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar en las composiciones, compuestos activos complementarios.

La administración puede ser efectuada por el sujeto o por otra persona, por ejemplo, un cuidador. Un cuidador puede ser cualquier entidad involucrada en proporcionar cuidado al ser humano: por ejemplo, un hospital, hospicio, consultorio médico, clínica de pacientes externos; un trabajador del cuidado de la salud, tal como un doctor, enfermera, u otro practicante; o una esposa o tutor, tal como un padre. El medicamento se puede proporcionar en dosis medidas, o en un dosificador que suministre 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 al sujeto que se esté siendo tratado, para suministrar la respuesta fisiológica anticipada.

El término "cantidad fisiológicamente efectiva" es la cantidad suministrada a un sujeto para suministrar el efecto paliativo o curativo deseado.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa que el portador puede ser llevado hasta los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos sobre los pulmones.

El término "coadministración" se refiere a la administración a un sujeto de dos o más agentes, y en particular dos o más agentes de ARNi. Los agentes pueden estar contenidos en una sola composición farmacéutica, o se pueden administrar al mismo tiempo, o los agentes pueden estar contenidos en una formulación separada, y se pueden administrar en serie al sujeto. Siempre que los dos agentes se puedan detectar en el sujeto al mismo tiempo, se dice que los dos agentes son coadministrados.

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

Los agentes de carga 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-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos, y similares; alditoles, tales manitol, xilitol, y similares. Un grupo preferido de carbohidratos incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas, y manitol. Los polipéptidos adecuados incluyen aspartame. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, siendo preferida la glicina.

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

#### Dosificación

Un agente de ARNi se puede administrar en una dosis unitaria aproximadamente menor a 75 mg por kg de peso corporal, o aproximadamente menor a 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 nmoles de agente de ARNi (por ejemplo, aproximadamente  $4.4 \times 10^{16}$  copias) por kg de peso corporal, o menor de 1.500, 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 nmoles de agente de ARNi por kg de peso corporal. La dosis unitaria, por ejemplo, se puede administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o intramuscular, intratecal, o directamente en un órgano), una dosis inhalada, o una aplicación tópica.

La dosificación puede ser una cantidad efectiva para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno. Se puede suministrar en forma profiláctica, o como la parte principal una parte de un protocolo de tratamiento.

En una forma de realización, la dosis unitaria se administra con menos frecuencia que una vez al día, por ejemplo menos de cada 2, 4, 8, o 30 días. En otra forma de realización, la dosis unitaria no se administra con una frecuencia (por ejemplo, no tiene una frecuencia regular). Por ejemplo, la dosis unitaria se puede administrar una sola vez. Debido a que el silenciamiento mediado por el agente de ARNi puede persistir durante varios días después de la administración de la composición del agente de ARNi, en muchos casos, es posible administrar la composición con una frecuencia de menos de una vez al día, o para algunas instancias, solamente una vez para todo el régimen

terapéutico.

5 En una forma de realización, se administra a un sujeto una dosis inicial, y una o más dosis de mantenimiento de un agente de ARNi, por ejemplo un agente de ARNi bicatenario, o un agente de ARNi corto (por ejemplo, un precursor, por ejemplo un agente de ARNi más grande que se pueda procesar hasta un agente de ARNi corto, o un ADN que  
 10 codifique un agente de ARNi, por ejemplo un agente de ARNi bicatenario, o un agente de ARNi corto, o un precursor de los mismos). La dosis o las dosis de mantenimiento generalmente son más bajas que la dosis inicial, por ejemplo menos de la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir el tratamiento del sujeto con una dosis o unas dosis en el intervalo de 0,01 a 75 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo de 70, 60, 50, 40, 30, 20,  
 15 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 al día. Las dosis de mantenimiento preferiblemente se administran no más de una vez cada 5, 10, o 30 días. Además, el régimen de tratamiento puede durar un período de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, de su severidad, y de la condición general del paciente. En las formas de realización preferidas, la dosificación se puede suministrar no más de una vez al día, por ejemplo no más de una vez cada 24, 36, 48, o más horas, por ejemplo, no más de una vez cada 5 u 8 días. Después del tratamiento, se puede monitorear al paciente para ver los  
 20 cambios en su condición, y el alivio de los síntomas del estado de enfermedad. La dosificación del compuesto se puede aumentar en el caso en que el paciente no responda de una manera significativa a los niveles de dosificación actuales, o se puede disminuir la dosis si se observa un alivio de los síntomas del estado de enfermedad, si se ha reducido el estado de enfermedad, o si se observan efectos secundarios indeseados.

20 La dosis efectiva se puede administrar en una sola dosis o en dos o más dosis, como se desee o como se considere apropiado de acuerdo con las circunstancias específicas. Si se desea facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, puede ser recomendable el implante de un dispositivo de suministro, por ejemplo una bomba, una cánula intraluminal semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal, o intracapsular), o un depósito.

25 Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a la terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, en donde el compuesto de la invención se administra en dosis de mantenimiento en el intervalo de 0,001 g a 100 g por kg de peso corporal (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.107.094).

30 La concentración de la composición del agente de ARNi es una cantidad suficiente para ser efectiva en el tratamiento o en la prevención de un trastorno, o para regular una condición fisiológica en seres humanos. La concentración o la cantidad del agente de ARNi administrada dependerá de los parámetros administrados para el agente, y del 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 objeto de evitar irritación o quemadura de los pasajes nasales. Algunas veces es recomendable diluir una formulación oral de 10 a 100 veces, con el objeto de proporcionar una formulación nasal adecuada.

35 Ciertos factores pueden tener influencia sobre la dosificación requerida para tratar efectivamente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, la severidad de la enfermedad o del trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. También se apreciará que la dosificación efectiva de un agente de ARNi, tal como un ARNi corto utilizado para el tratamiento, puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento particular. Pueden resultar cambios en la dosificación y llegar a ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, se puede monitorear el sujeto después de la  
 40 administración de una composición de agente de ARNi. Con base en la información del monitoreo, se puede administrar una cantidad adicional de la composición del agente de ARNi.

45 La dosificación depende de la severidad y respuesta de la enfermedad o condición que se vaya a tratar, durando el curso de tratamiento desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad. Se pueden calcular programas de dosificación óptima a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las personas ordinariamente capacitadas en el arte pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación, y los índices de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos individuales, y en general se pueden estimar con base en las EC50 que se encontró que eran efectivas en los modelos animales *in vitro* e *in vivo*, como se describió anteriormente.

50 Los agentes de ARNi como se describe en la presente invención, pueden ser útiles en el tratamiento, y (cuando sea apropiado) en la prevención de cualquiera de las siguientes enfermedades/trastornos:

Fibrosis quística, síndrome de Liddles, insuficiencia renal, hipertensión, desequilibrios de electrolitos.

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

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como una limitación adicional.

### Ejemplos

Fuente de los reactivos

- 5 Cuando no se suministre la fuente de un reactivo específicamente, este reactivo se puede obtener con cualquier proveedor de reactivos para biología molecular, con una calidad/pureza estándar para aplicaciones en biología molecular.

#### Ejemplo 1: Selección de secuencias

- 10 Con el objeto de identificar los ARNi corto terapéuticos para disminuir la expresión de la subunidad alfa del canal de sodio epitelial ENaC ( $\alpha$ -ENaC), se definieron grupos de cribado basándose en un análisis bioinformático. Los operadores clave para el diseño de los grupos de cribado fueron la especificidad predicha de los ARNi corto contra el transcriptoma de las especies relevantes. Para la identificación de los ARNi corto para alfa-ENaC, y un sistema de suministro eficiente, se utilizó un enfoque de tres puntos: se seleccionó la rata como la especie de prueba para abordar la eficacia del silenciamiento *in vivo* después del suministro intratraqueal; se seleccionó el cobayo como el organismo modelo de la enfermedad para demostrar que la reducción del ARNm para alfa-ENaC da como resultado un efecto funcional mensurable. La molécula de ARNi corto terapéutica tiene que dirigirse al alfa-ENaC humano, así como a la secuencia de alfa-ENaC de al menos una especie toxicológicamente relevante; en este caso, el mono Rhesus.

- 20 El análisis inicial de la secuencia relevante del ARNm para alfa-ENaC, reveló que se pueden identificar pocas secuencias que satisfagan los requerimientos de especificidad, y al mismo tiempo el ARNm objetivo para alfa-ENaC en todas las especies relevantes. Por consiguiente, se decidió diseñar grupos de cribado independientes para el ARNi corto terapéutico y para las moléculas sustitutas que se fueran a probar en el modelo de enfermedad relevante (Tablas 1A, 1B, 1C y 1D).

- 25 Todos los ARNi corto reconocen la secuencia del alfa-ENaC humano, debido a que se seleccionó un sistema de cultivo celular humano para la determinación de la actividad *in vitro* (H441, véase más adelante). Por consiguiente, todos los ARNi corto se pueden utilizar para dirigirse al ARNm para alfa-ENaC humano en un escenario terapéutico.

Los grupos de cribado terapéuticos se diseñaron para contener solamente secuencias de ARNi corto que sean completamente complementarias con las secuencias de alfa-ENaC humano y de mono Rhesus.

Diseño y selección *in silico* de ARNi corto que se dirigen al alfa-ENaC (SCNN1A)

- 30 Se llevó a cabo el diseño del ARNi corto para identificar los ARNi corto para los cuatro grupos previamente definidos (véase más arriba).

a) "Conjunto de cribado inicial".

b) "Conjunto de cribado extendido".

c) "Conjunto sustituto *in vivo* para rata".

- 35 d) "Conjunto sustituto *in vivo* para cobayo".

Conjunto de cribado inicial

- 40 El objetivo para la selección *in silico* de un conjunto de cribado inicial, fue identificar los ARNi corto que se dirigieran específicamente al alfa-ENaC humano, así como a su ortólogo de mono Rhesus. El ARNm objetivo humano (NM\_001038.4) se descargó del recurso del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) durante el procedimiento de selección completo de ARNi corto. Con el objeto de identificar el ortólogo de alfa-ENaC de Rhesus (*Macaca mulatta*), se utilizó la secuencia humana en una búsqueda con blastn en el Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/?organism=Mmulatta>) contra los cóntigos de Mmulatta a partir de 2004 10 01. Todas las regiones encontradas se extrajeron y se ensamblaron mediante la herramienta de ensamble CAP para generar una primera secuencia de ensamble. Además, se llevó a cabo una búsqueda con BLAST con la secuencia humana en UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Rhesus&db=rheMac2&hgside=84859356>) contra Rhesus



congelada el 12 de marzo de 2005. El encuentro del andamiaje 84554 se descargó y se utilizó junto con la primera secuencia de ensamble mediante CAP, para generar la secuencia en consenso final para el alfa-ENaC de Rhesus.

5 En seguida de la extracción de todas las secuencias de 19 mer traslapadas fuera del ARNm humano, se identificaron los 19 mer conservados que tenían secuencias idénticas en la secuencia en consenso ensamblada de Rhesus. Estas secuencias de 19 mer se definieron como la reserva de secuencias de ARNi corto (sentido) de reactividad cruzada de humano-Rhesus, representadas por 1185 de 19 mers.

10 Se generaron las secuencias antisentido correspondientes y se probaron para determinar su especificidad en seres humanos. Para esto, se tomó como parámetro su potencial predicho para interactuar con los ARNm objetivo irrelevantes (potencial fuera del objetivo), que se tomó como un parámetro. Las secuencias con un bajo potencial fuera del objetivo se definieron como preferibles, y se predijo que eran más específicas.

Para una selección adicional, los ARNi corto candidatos se clasificaron de acuerdo con su potencial predicho para interactuar con otras secuencias huésped (aquí, sin limitación, un ser humano). Se asumió que los ARNi corto con un bajo potencial fuera del objetivo eran más específicos *in vivo*. Para predecir el potencial fuera del objetivo específico del ARNi corto, se hicieron las siguientes suposiciones:

15 1) El potencial fuera del objetivo de una cadena se puede deducir a partir del número y de la distribución de los malos emparejamientos con un fuera de objetivo;

2) El fuera de objetivo más relevante, que es el gen que se predijo que tiene la más alta probabilidad de ser silenciado debido a la tolerancia de malos emparejamientos, determina el potencial fuera del objetivo de la cadena;

20 3) Las posiciones 2 a 9 (contando de 5' a 3') de una cadena (región de siembra) pueden contribuir más al potencial fuera del objetivo que el resto de la secuencia (es decir, la región que no es de siembra y del sitio de disociación) (Haley, B., y Zamore, P. D., Nat. Struct. Mol Biol. 2004, 11: 599);

4) Las posiciones 10 y 11 (contando de 5' a 3') de una cadena (región del sitio de disociación) pueden contribuir más al potencial fuera del objetivo que la región que no es de siembra (es decir, las posiciones 12 a 18, contando de 5' a 3');

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

6) El potencial fuera del objetivo se puede expresar mediante el puntaje fuera de objetivo del fuera de objetivo más relevante, calculado con base en el número y en la posición de malos emparejamientos de la cadena, con la región más homóloga en el gen fuera del objetivo, considerando las suposiciones 3 a 5;

30 7) Suponiendo un fracaso potencial de la actividad de la cadena sentido mediante las modificaciones internas introducidas, solamente será relevante el potencial fuera del objetivo de la cadena antisentido.

Para identificar los genes potenciales fuera del objetivo, se sometieron las secuencias antisentido de 19 mer a una búsqueda de homologías contra las secuencias de ARNm humanas públicamente disponibles, que se supone que representaban el transcriptoma exhaustivo humano.

35 Para este propósito, se llevaron a cabo búsquedas con fastA (versión 3.4) con todas las secuencias de 19 mer contra una base de datos RefSeq humana (versión disponible en <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/> el 18 de noviembre de 2005). La búsqueda con fastA se realizó con parámetros-valores-pares -f 30 -g 30 con el propósito de tomar en consideración la homología sobre la longitud completa de las 19 mer sin ninguna brecha. Además, con el fin de asegurar el listado de todos los encuentros fuera del objetivo relevantes en el archivo producido por fastA, se utilizó el parámetro -E 15000.

40 La búsqueda dio como resultado un listado de fuera del objetivo potenciales para cada secuencia de entrada enlistada por homología de secuencia descendente sobre la de 19 mer completa.

Con el fin de clasificar todos los fuera del objetivo potenciales de acuerdo con las suposiciones 3 a 5, y mediante esto identificar el gen fuera del objetivo más relevante y su puntaje fuera del objetivo, se analizaron los archivos producidos por fastA mediante un guión perl.

45 El guión extrajo las siguientes propiedades fuera del objetivo para cada secuencia introducida de 19 mer y para cada gen fuera del objetivo, para calcular el puntaje fuera del objetivo:

Número de malos emparejamientos en la región que no es de siembra.

Número de malos emparejamientos en la región de siembra.

Número de malos emparejamientos en la región del sitio de disociación.

El puntaje fuera del objetivo se calculó considerando las suposiciones 3 a 5 como sigue:

$$\begin{aligned}
 & \text{Puntaje fuera del objetivo} &= & \text{Número de malos emparejamientos de siembra} * 10. \\
 5 & & & + \text{número de malos emparejamientos del sitio de disociación} * 1,2. \\
 & & & + \text{número de malos emparejamientos que no son de siembra} * 1.
 \end{aligned}$$

10 El gen fuera del objetivo más relevante para cada secuencia de 19 mer se definió como el gen con el puntaje fuera del objetivo más bajo. De acuerdo con lo anterior, el puntaje fuera del objetivo más bajo se definió como el representativo del potencial fuera del objetivo de cada ARNi corto, representado por la secuencia antisentido de 19 mer analizada.

Se utilizó el potencial fuera del objetivo calculado como el parámetro de selección (descendente por el puntaje fuera del objetivo), con el propósito de generar una clasificación para todas las secuencias de ARNi corto de reactividad cruzada de humano-Rhesus.

15 Un puntaje fuera del objetivo de tres o más se definió como un requisito previo para la selección de ARNi corto, mientras que todas las secuencias que contenían cuatro o más de G en una fila (secuencias poli-G) fueron excluidas, conduciendo a la selección de un total de 152 ARNi corto que se dirigen al alfa-ENaC humano y de Rhesus (véase la Tabla 1a).

Conjunto de cribado extendido

20 El objetivo para la selección *in silico* del conjunto de cribado extendido, fue identificar todos los ARNi corto adicionales que se dirigen al alfa-ENaC humano con suficiente especificidad, que se excluyeron del grupo inicial debido a la pérdida de reactividad cruzada con Rhesus. Se tomaron las secuencias restantes de la reserva de 19 mers derivadas a partir del alfa-ENaC humano que no se han analizado antes, y se generaron las secuencias antisentido correspondientes. El gen fuera del objetivo más relevante y sus correspondientes puntajes fuera del objetivo, se calcularon como se describe en la sección del "conjunto de cribado inicial".

25 Para la determinación de la reactividad cruzada con el ratón y el de cobayo (*Cavia porcellus*), se descargaron las secuencias de alfa-ENaC de estas especies de la base de datos de nucleótidos del NCBI <sup>1</sup> (números de acceso NM\_011324.1 y AF071230 (longitud completa)/DQ109811 (cds parcial), respectivamente). Las dos secuencias de cobayo se utilizaron para generar una secuencia en consenso de alfa-ENaC de cobayo. Se probó cada secuencia de 19 mer humana para determinar su presencia en las secuencias de ratón y de cobayo. Las secuencias positivas se asignaron a la reserva de secuencias de ARNi corto (sentido) de reactividad cruzada de humano-ratón, o de las secuencias de ARNi corto (sentido) de reactividad cruzada de humano-cobayo. Después de la exclusión de todas las secuencias de poli-G, se seleccionaron las secuencias con puntajes fuera del objetivo de 3 o más, así como aquellas con puntajes fuera del objetivo de 2,2 o de 2,4 y reactividad cruzada con ratón, Rhesus, o cobayo. El número total de ARNi corto en la reserva de cribado extendida fue de 344 (véase la Tabla 1b).

35 Conjunto sustituto de rata *in vivo*

40 El objetivo de la selección *in silico* del conjunto sustituto de rata *in vivo* fue identificar todos los ARNi corto que se dirigieran al alfa-ENaC humano y de rata con suficiente especificidad en rata. Para la identificación de los ARNi corto de reactividad cruzada de humano-rata, se descargó la secuencia de ARNm para alfa-ENaC de rata de la base de datos de nucleótidos del NCBI (número de acceso NM\_031548.2), y todas las secuencias fuera de la reserva de 19 mers humanas se analizaron para determinar la presencia en la secuencia de rata, que representaba la reserva de las secuencias de ARNi corto (sentido) de reactividad cruzada de humano-rata.

45 Se generaron las secuencias antisentido correspondientes, y se probaron para determinar su especificidad en rata. Para esto, se calcularon el gen fuera del objetivo más relevante en rata y sus correspondientes puntajes fuera del objetivo, como se describe en la sección del "conjunto de cribado inicial", utilizando el conjunto de ARNm (base de datos RefSeq) en lugar de los transcritos humanas. Después de la exclusión de todas las secuencias poli-G, se generó una clasificación, considerando el puntaje fuera del objetivo de rata en primera prioridad, y el puntaje fuera del objetivo humano con segunda prioridad. Las 48 secuencias desde la parte superior de la lista fueron finalmente seleccionadas, representando al conjunto sustituto de rata *in vivo* (véase la Tabla 1c).

Conjunto sustituto de cobayo *in vivo*

El objetivo de la selección *in silico* del conjunto sustituto de cobayo *in vivo*, fue identificar todos los ARNi corto que se dirigieran al alfa-ENaC humano y de cobayo, que no se hubieran seleccionado en grupos anteriores. Los ARNi corto restantes del conjunto previamente determinado de las secuencias de ARNi corto (sentido) de reactividad cruzada de humano-cobayo, se clasificaron de acuerdo con los puntajes fuera del objetivo humanos. Se seleccionaron las 63 secuencias superiores (excluyendo las secuencias poli-G), que representaban el conjunto sustituto de cobayo *in vivo* (véase la Tabla 1d).

**Ejemplo 2:** Síntesis de ARNi corto

## Síntesis de los nucleótidos que comprenden bases naturales

Debido a que los ARNi corto de los conjuntos de cribado son todos potencialmente pretendidos para administración *in vivo*, se sintetizaron los ARNi corto con una estrategia de modificación que protege a los ARNi corto de la degradación por las endo y exonucleasas, en un medio ambiente biológico. En esta estrategia, se protegen los extremos 3' de ambas cadenas de una actividad exonucleolítica 3' -> 5', mediante un enlace fosforotioato entre las dos últimas nucleobases en el extremo 3'. Con el objeto de inhibir la degradación endonucleolítica del ARNi corto, todas las pirimidinas en la cadena sentido del ARNi corto fueron reemplazadas con el ribonucleótido modificado por 2'-O-metilo correspondiente. Para reducir el número de modificaciones en la cadena antisentido, que es la cadena más activa, y por consiguiente, más sensible a las modificaciones, solamente se modificaron las pirimidinas en el contexto de los sitios de disociación de la nucleasa principal previamente identificada con los grupos 2'-O-metilo. Los sitios de disociación principales son los siguientes dos motivos de secuencia: 5'-UA-3' y 5'-CA-3'.

Debido a que también se ha considerado utilizar los ARNi corto en formulaciones que protejan potencialmente a los ARNs del medio ambiente biológico nucleolítico en el pulmón, también se sintetizó el mismo conjunto de los ARNi corto sin protección alguna de la degradación endonucleolítica.

Cuando la fuente de un reactivo no se suministra específicamente en la presente invención, este reactivo se puede obtener con cualquier proveedor de reactivos para biología molecular, con un estándar de calidad / pureza para aplicación en biología molecular.

Los ARN monocatenarios se produjeron mediante síntesis en fase sólida a una escala de 1  $\mu$ mol, utilizando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemania), y vidrio de poros controlados (CPG, 500 Ångstroms, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como el soporte sólido. El ARN, y el ARN que contenía los nucleótidos de 2'-O-metilo, se generaron mediante síntesis en fase sólida, empleando las fosforamiditas y las fosforamiditas de 2'-O-metilo correspondientes, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Estos bloques de construcción se incorporaron en los sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena del oligorribonucleótido, utilizando química de fosforamidita de nucleósido convencional, tal como se describe en Current Protocols in Nucleic acid chemistry, Beaucage, S. L. y colaboradores (Editores), John Wiley Sons, Inc., Nueva York, NY, EUA. Los enlaces de fosforotioato se introdujeron mediante el reemplazo de la solución oxidante de yodo, con una solución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd., Glasgow, Reino Unido) en acetónitrilo (al 1%). Otros reactivos auxiliares se obtuvieron a través de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

La desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos sin procesar mediante HPLC de intercambio de aniones se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos. Los rendimientos y las concentraciones se determinaron mediante absorción ultravioleta de una solución del ARN respectivo, a una longitud de onda de 260 nm, utilizando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se generó el ARN bicatenario mezclando una solución equimolar de cadenas complementarias en el regulador de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85 - 90° C durante 30 minutos, y se enfrió a temperatura ambiente durante un período de 3 a 4 horas. La solución de ARN hibridado se diluyó hasta una concentración de 50  $\mu$ moles de ARN bicatenario / L, y se almacenó a -20° C hasta su uso.

**Ejemplo 3:** Ensayo del ARNi corto *in vitro*

Se probó la capacidad de los agentes de ARNi para inhibir la expresión de alfa-ENaC en líneas celulares humanas *in vitro*, o en ratas *in vivo*. El agente de ARNi se transfecta en las células, por ejemplo, mediante transfección, se deja actuar sobre las células durante cierto tiempo, por ejemplo 24 horas, y se determinan los niveles de ARNm para alfa-ENaC mediante análisis de ARN ramificado. Alternativamente, el agente de ARNi se administra *in vivo* a través de la vía intratraqueal, y se determina la inhibición de la expresión del ARNm para alfa-ENaC mediante el análisis del ADN ramificado sobre el órgano objetivo. Complementando estos ensayos directos, se analizó la inhibición de la expresión del gen objetivo por los agentes de ARNi para el ARNm para alfa-ENaC expresado en forma recombinante en células huésped de mamífero.

## Lineas celulares

Se obtuvieron células H441 de la American Type Culture Collection (ATCC Número: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania), y se cultivaron en RPMI 1640, suero fetal de ternero al 10%, 100 u de penicilina / 100 µg/mL de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, y piruvato de sodio 1 mM (todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania) a 37°C, bajo una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire atmosférico.

Las células epiteliales bronquiales humanas primarias se obtuvieron a través de Cambrex (Cat # CC-2540), y se cultivaron rutinariamente en un medio BEGM con SingleQuots (Cambrex Cat # CC-3170 sin tri-yodotreonina). Para la polarización y el crecimiento en la interfase aire-líquido, se cultivaron las células en una mezcla en proporción 1:1 de BEGM:DMEM complementado con 4,5 g/L de D-Glucosa (Gibco BRL Cat # 41965-039), y se complementaron con SingleQuots (Cambrex Cat # CC-4175), como anteriormente, pero sin la tri-yodotreonina y las alícuotas de GA1000, y en presencia de 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco BRL Cat # 10131-015). Debido a que las células se mantuvieron en un medio libre de suero, se utilizó la solución de neutralización de tripsina durante las etapas de pasada (Cambrex Cat # CC-5002). Para la polarización y el cultivo en la interfase aire-líquido, se cultivaron las células sobre soportes de policarbonato semipermeables (0,4 micras) (Corning Costar Cat # 3407 #3460), y se cultivaron todo el tiempo a 37° C bajo una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire.

Las células de riñón de mono verde africano Cos-1 (ATCC # CRL-1650) se cultivaron en MEM de Dulbecco, 4,5 g/L de glucosa, suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Gibco BRL), 100 unidades de penicilina/100 µg/mL de estreptomycin.

**Ejemplo 3.1:** Cribado *in vitro* para la determinación de los ARNi corto para alfa-ENaC activos y de IC50 en H441

Un día antes de la transfección, se indujo la expresión de alfa-ENaC en células H441 (ATCC Número: HTB-174, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania), mediante la adición de 100 nM de dexametasona. Directamente antes de la transfección, se sembraron las células a razón 1,5 x 10<sup>4</sup> células/pozo, en placas de 96 pozos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) en 75 µL de medio de cultivo (RPMI 1640, suero fetal de ternera al 10%, 100 unidades de penicilina/100 µg/mL de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, y piruvato de sodio 1 mM, todos de Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las transfecciones se llevaron a cabo por cuadruplicado. Para cada pozo, se mezclaron 0,5 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) con 12 µL de Opti-MEM (Invitrogen), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la concentración del ARNi corto con una concentración de 50 nM en el volumen de transfección de 100 µL, se mezcló 1 µL de un ARNi corto 5 µM con 11,5 µL de Opti-MEM por pozo, se combinó con la mezcla de Lipofectamina 2000-Opti-MEM, y nuevamente se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los complejos de ARNi corto - Lipofectamina 2000 se aplicaron completamente (25 microlitros cada vez por pozo) a las células, y se incubaron las células durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora humidificada (Heraeus GmbH, Hanau).

Se cosecharon las células mediante la aplicación de 50 µL de mezcla de lisis (contenido del kit QuantiGene bDNA de Genospectra, Fremont, EUA) a cada pozo que contenía 100 µL de medio de cultivo, y se lisaron a 53°C durante 30 minutos. Después, se incubaron 50 µL de los lisados con conjuntos de sondas específicos para alfa-ENaC humana y GAPDH humano (para las secuencias de los conjuntos de sondas, véase más abajo), y se procedió de acuerdo con el protocolo del fabricante para QuantiGene. Al final, se midió la quimiluminiscencia en un Victor2-Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como la RLU (unidades relativas de luz), y se normalizaron los valores obtenidos con el conjunto de sondas hENaC con los valores respectivos de GAPDH para cada pozo. Los valores obtenidos con los ARNi corto dirigidos contra alfa-ENaC se relacionaron con el valor obtenido con un ARNi corto no específico (dirigido contra HCV), que se fijó en el 100%. El porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC para los ejemplos de ARNi corto, se muestra en las Tablas 1A - 1D.

Los ARNi corto efectivos del cribado, se caracterizaron adicionalmente mediante curvas de respuesta a la dosis. Se llevaron a cabo transfecciones de curvas de respuesta a la dosis con 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 simulado (sin ARNi corto), y se diluyeron con Opti-MEM hasta una concentración final de 12,5 µL, de acuerdo con el protocolo anterior. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el complemento de software de Microsoft Excel, XL-fit 4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, Reino Unido), y aplicando el número de modelo sigmoidal 606.

## Conjuntos de Sondas:

50

alfa-ENaC humana:

Nombre FPL	Miembros	Función	Secuencia	SEQ ID NO:
hENAC001	.235.255.CE	CE	gtctgtccagggttctctccTTTTTctcttgaaagaaagt	1645
hENAC002	.274.293.CE	CE	actgccattctgtgagcagTTTTTctcttgaaagaaagt	1646
hENAC003	.344.367.CE	CE	ctctcctggaagcaggagtgataTTTTTctcttgaaagaaagt	1647
hENAC004	.391.411.CE	CE	gcccgatagaagatgtaggTTTTTctcttgaaagaaagt	1648
hENAC005	.501.521.CE	CE	gcactgggtgaaacagcccagTTTTTctcttgaaagaaagt	1649
hENAC006	.539.560.CE	CE	agcagagagctggtagctggcTTTTTctcttgaaagaaagt	1650
hENAC007	.256.273.LE	LE	cgccataatcgcccaTTTTTtaggcataggaccctgtct	1651
hENAC008	.368.390.LE	LE	cacacccactcctgcatgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1652
hENAC009	.412.431.LE	LE	acagtactccacgttctgggTTTTTtaggcataggaccctgtct	1653
hENAC010	.455.477.LE	LE	ggagcttatagtagcagtagccccTTTTTtaggcataggaccctgtct	1654
hENAC011	.522.538.LE	LE	acgtgcatgctccgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1655
hENAC012	.561.580.LE	LE	gaggccatcgtgagtaaccTTTTTtaggcataggaccctgtct	1656
hENAC013	.214.234.BL	BL	Tcatgctgatggaggtctcca	1657
hENAC014	.294.318.BL	BL	Ggtaaaggtctcaacaggaacatc	1658
hENAC015	.319.343.BL	BL	Cacacctgctgtgtagcttgaag	1659
hENAC016	.432.454.BL	BL	Caggaactgtgcttctgtagtc	1660
hENAC017	.478.500.BL	BL	Gtggctgaggagaagtcaacct	1661
hENAC018	.581.599.BL	BL	Ccattcctgggatgtcacc	1662
hGAP001	AF261085.252.271.CE	CE	gaattgccatgggtggaatTTTTTctcttgaaagaaagt	1663
hGAP002	AF261085.333.352.CE	CE	ggagggatctcgtcctggaTTTTTctcttgaaagaaagt	1664
hGAP003	AF261085.413.431.CE	CE	ccccagccttccatggtTTTTTctcttgaaagaaagt	1665
hGAP004	AF261085.432.450.CE	CE	gtccccctgcaaatgagTTTTTctcttgaaagaaagt	1666
hGAP005	AF261085.272.289.LE	LE	agccttgacggtgccatgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1667
hGAP006	AF261085.290.310.LE	LE	gatgacaagctcccgttctTTTTTtaggcataggaccctgtct	1668
hGAP007	AF261085.311.332.LE	LE	agatggtgatggattccattTTTTTtaggcataggaccctgtct	1669
hGAP008	AF261085.353.372.LE	LE	gcatcgcccactgtattTTTTTtaggcataggaccctgtct	1670
hGAP009	AF261085.373.391.LE	LE	cacgacgtactcagcgccaTTTTTtaggcataggaccctgtct	1671
hGAP010	AF261085.451.472.LE	LE	ggcagagatgatgaccttggTTTTTtaggcataggaccctgtct	1672
hGAP011	AF261085.392.412.BL	BL	Ggtgaagacgcagtgactc	1673

Las IC50 para los ejemplos de ARNi corto se muestran en las Tablas 2A y 2B.

**Ejemplo 3.2:** Desactivación genética transitoria de alfa-ENaC en un modelo epitelial bronquial humano primario

5 Se sembraron células epiteliales bronquiales humanas (referencia del donador 4F1499) en placas de 24 pozos a razón de  $1 \times 10^5$  células por pozo, en 0,5 mL de medio de cultivo, 1 día antes de la transfección. Las células eran 70% confluentes el día de la transfección del ARNi corto.

10 Cada ARNi corto se volvió a suspender a razón de 100 nM en 1 mL de OptiMem 1 (Invitrogen), y en un tubo separado, se diluyó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) a razón de 6 µL/mL en OptiMem, produciendo una cantidad suficiente para la transfección de cuatro réplicas en una placa de 24 pozos. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, se combinaron las mezclas para obtener la concentración final deseada de ARNi corto 50 nM y 3 µL/mL de Lipofectamina 2000. Se incubó la mezcla de transfección durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente, y se agregaron 420 µL del complejo de ARNi corto/reactivo a cada pozo, de acuerdo con el diseño experimental. Se sacudieron suavemente las placas para asegurar una mezcla completa, y luego se incubaron a 37° C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire durante 4 horas. Posteriormente, se aspiró la mezcla de 15 transfección, y se regresaron las células a las condiciones de cultivo normales durante 20 horas adicionales.

20 Se prepararon los lisados celulares para el análisis de ADN ramificado. Se preparó una mezcla en proporción 2:1 de medio:amortiguador de lisis (Panomics), y se lisaron las células en 200 µL a 53°C durante 30 minutos. Después de una verificación visual para determinar la lisis completa, se almacenaron los lisados celulares a -80°C para el siguiente análisis. El análisis de ADN ramificado se llevó a cabo 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 se aplicaron 20 µL de muestra a cada pozo en este caso.

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

**Ejemplo 3.3:** Inhibición in vitro de la expresión del gen para alfa-ENaC cinomolgo clonado expresado en forma exógena, para los agentes de ARNi seleccionados, en células Cos-1

Clonación de la secuencia de alfa-ENaC de cinomolgo

5 Las secuencias cebadoras para la amplificación de la 5'-UTR y las CDS (los nucleótidos mostrados entre paréntesis corresponden a la secuencia de cADN para  $\alpha$ -ENaC de *Macaca mulatta* (mono Rhesus)):

P745: 5'- CTCCATGTTCTGCGGCCGCGGATAGAAG-3' (nt 1427) (SEQ ID NO: 1674)

P733: 5'- CCGGCCGCGGGCGGGCT-3' (nt 1) (SEQ ID NO: 1675)

P734: 5'- CTCCCCAGCCCCGGCCGCT-3' (nt 17) (SEQ ID NO: 1676)

P735: 5'- GGCCGCTGCACCTGTAGGG-3' (nt 28) (SEQ ID NO: 1677)

10 Las secuencias cebadoras para la amplificación de CDS y 3'-UTR:

P737: 5'- ATGGAGTACTGTGACTACAGG-3' (nt 1422) (SEQ ID NO: 1678)

P740: 5'- TTGAGCATCTGCCTACTTG-3' (nt 3113) (SEQ ID NO: 1679)

Las secuencias cebadoras para la amplificación de la parte interna de CDS:

P713: 5'- 5'-ATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGG-3' (nt 1182) (SEQ ID NO: 1679)

15 P715: 5'- 5'-TCAGGGCCCCCCCAGAGG-3' (nt 2108) (SEQ ID NO: 1680)

20 El ARN total de pulmón de cinomolgo (*Macaca fascicularis*) (# R1534152-Cy-BC) se adquirió a través de BioCat (Alemania). La síntesis del ADNc se llevó a cabo utilizando el Sistema de Síntesis de la Primera Cadena SuperScript III (Invitrogen). La síntesis del ADNc se llevó a cabo utilizando ya sea hexámeros aleatorios o bien cebadores de oligo dT. Además, el ADNc de la primera cadena de pulmón de cinomolgo también se adquirió a través de BioCat (# C1534160-Cy-BC). Para la amplificación por PCR, se utilizó el kit Advantage 2 PCR (# K1910-1, Clontech). La amplificación de la 5'-UTR y de partes de la CDS, se realizó utilizando P745 y una mezcla equimolar de P733, P734, y P735. Para la amplificación por PCR de la CDS y la 3'-UTR, se utilizaron los cebadores P737 y P740. Se utilizaron los cebadores P713 y P715 para la amplificación de partes de la CDS.

25 Todos los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y luego se clonaron en el vector pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) en bacterias TOP10. Luego se recogieron los clones, y se aisló el ADN utilizando el kit Qiagen Miniprep. Después de la digestión con enzima de restricción *EcoRI*, y del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, se sometió el ADN de los clones correctos a secuenciación.

30 Se alinearon luego las secuencias con la secuencia de ADNc para alfa-ENaC de mono Rhesus, y se alinearon las secuencias de los clones individuales entre sí. Luego se clonó la longitud completa del ADNc para alfa-ENaC de cinomolgo mediante digestión de la parte 5' (5'-UTR y CDS, clon 55) con *EcoR I* y *Not I*, digestión de la parte media de la CDS con *Not I* y *BstE II* (clon 15), y la parte 3' (CDS y 3'-UTR) mediante *BstE II* y *EcoR V* (clon 80). Los fragmentos de ADN digeridos se subclonaron entonces en pcDNA3.1, digerido con *EcoR I* y *EcoR V*. El ADNc de longitud completa para alfa-ENaC de cinomólogo en pcDNA3.1 se sometió entonces a secuenciación de longitud completa (Ingenetix, Viena, Austria). La secuencia del ADNc para alfa-ENaC de cinomolgo corresponde a los nucleótidos 28 a 3113 de la secuencia de ADNc para alfa-ENaC de Rhesus. Finalmente, se separó luego el ADNc para alfa-ENaC de cinomolgo del alfa-ENaC de cinomolgo pcDNA3.1 mediante digestión con *BamH I* y *EcoR V*, y se subclonó en el vector pXOON. El mapa del plásmido se ilustra en la Figura 1. La Figura 2 describe la secuencia de proteína (SEQ ID NO: 1681) y del ADN (SEQ ID NO: 1682) del alfa-ENaC de cinomolgo.

Transfecciones:

40 Se sembraron las células Cos-1 a razón de  $6 \times 10^4$  células/pozo, en placas de 24 pozos cada una, en 0,5 mL de medio de cultivo. Un día después de la siembra, se cotransfectaron las células con el plásmido de expresión de alfa-ENaC de cinomolgo pXOON, y el ARNi corto indicado. Para cada pozo, se cotransfectaron 4 ng de plásmido de expresión de alfa-ENaC y 600 ng de plásmido portador (pNFAT-luc) con el ARNi corto relevante (concentración final de 45 nM), utilizando el reactivo de transfección génica X-treme (Roche) a razón de 3.75  $\mu$ L/pozo, en un volumen total de 720  $\mu$ L/pozo de Opti-MEM (Invitrogen) como se describe a continuación.

5 Las transfecciones se llevaron a cabo por triplicado para cada muestra. Se prepararon mezclas maestras de plásmido/ARNi corto (cada una para 3,5 pozos) de la siguiente forma: 14 ng de plásmido de expresión de alfa-ENaC, 2,1 µg de plásmido portador, y 112 pmoles del ARNi corto relevante, en un volumen total de 210 µL (Opti-MEM). Se preparó una mezcla maestra de lípido para la transfección completa (105 µL de lípido más 1575 µL de Opti-MEM para ocho muestras de transfección por triplicado). Se mezclaron el plásmido/ARNi corto y el lípido en un volumen igual, para producir un volumen total de 420 µL de mezcla de transfección por muestra triplicada (3,5 veces). Después de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 120 µL de la mezcla de transfección relevante a cada pozo de células, en un volumen de transfección final de 720 µL (opti-MEM). Se transfectoron las células durante 24 horas a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora humidificada (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania), y se las cosechó para el análisis del ADN ramificado.

15 Se prepararon lisados celulares para el análisis del ADN ramificado. Se preparó una mezcla en proporción de 2:1 de medio:amortiguador de lisis (Panomics), y se lisaron las células en 200 µL a 53°C durante 30 minutos. Después de una verificación visual para comprobar la lisis completa, se almacenaron los lisados celulares a -80°C para el siguiente análisis. El análisis del ADN ramificado se llevó a cabo como se describió anteriormente, con la expresión de alfa-ENaC de cinomolgo normalizada contra eGFP del plásmido de expresión. El protocolo de análisis de ADN ramificado empleado difiere del anterior solamente en que se aplicaron 20 µL de muestra a cada pozo en este caso.

Conjunto de sondas:

Alfa-ENaC de cinomólogo

Nombre FLP	Función	Secuencia	SEQ ID NO:
cyENa001	CE	cgccgtgggctgctgggTTTTTctcttgaaagaaagt	1683
cyENa002	CE	ggtaggagcggtggaactTTTTTctcttgaaagaaagt	1684
cyENa003	CE	cagaagaactcgaagagctctcTTTTTctcttgaaagaaagt	1685
cyENa004	CE	cccagaaggcctctcatTTTTTctcttgaaagaaagt	1686
cyENa005	LE	ggtgcagagccagagcactgTTTTTctcttgaaagaaagt	1687
cyENa006	LE	gtgccgcaggttctgggTTTTTtaggcataggaccctgtct	1688
cyENa007	LE	gatcagggcctcctcctcTTTTTtaggcataggaccctgtct	1689
cyENa008	LE	ccgtggatggtgattgttgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1690
cyENa009	LE	gcggttgctgggagcTTTTTtaggcataggaccctgtct	1691
cyENa0010	LE	ttgccagtacatcatgccaatTTTTTtaggcataggaccctgtct	1692
cyENa0011	BL	acaccaggcggatggcg	1693

eGFP:

Nombre FLP	Función	Secuencia	SEQ ID NO:
EGFP001	CE	ggcacgggtagctgctTTTTTctcttgaaagaaagt	1694
EGFP002	CE	ggtagcggctgaagcactgTTTTTctcttgaaagaaagt	1695
EGFP003	CE	cctggacgtagcctcgggTTTTTctcttgaaagaaagt	1696
EGFP004	CE	cctgaagaagatggtgctTTTTTctcttgaaagaaagt	1697
EGFP005	LE	cgaactcacctcggcgcTTTTTctcttgaaagaaagt	1698
EGFP006	LE	ccttcagctcgtgctggTTTTTctcttgaaagaaagt	1699
EGFP007	LE	gtcacgagggtggccagTTTTTtaggcataggaccctgtct	1700
EGFP008	LE	cacgccgtaggtcagggtgTTTTTtaggcataggaccctgtct	1701
EGFP009	LE	gtgctgctcatgtgctggTTTTTtaggcataggaccctgtct	1702
EGFP010	LE	tcaccagggtgctgcctTTTTTtaggcataggaccctgtct	1703
EGFP011	BL	cggtggtcagatgaactca	1704
EGFP012	BL	catggcggactgaagaagtc	1705
EGFP013	BL	cgctcctctgaagtcatgct	1706

La Tabla 2C muestra la expresión de alfa-ENaC en especies cinomólogas para los ejemplos de ARNi corto.

20 **Ejemplo 3.4:** Cribado para la inducción del interferón-α

Con el fin de evaluar la capacidad del ARNi corto para estimular la liberación del interferón- α (IFNα), se incubó ARNi corto con células mononucleares de sangre periférica recién purificadas (PMBC) *in vitro* durante 24 horas. Se añadió el ARNi corto ya sea directamente a las PMBC, o primero se formó un complejo con un agente de transfección de

lípidos (agente de transfección GenePorter 2 o Lipofectamina 2000 o DOTAP), y posteriormente se incubó con las PMBC. Como los controles positivos para la inducción de IFN $\alpha$ , se incluyeron las secuencias de control no modificadas DI\_A\_2216 y DI\_A\_5167.

DI\_A\_2216: es una molécula de ADN antisentido monocatenaria.

5 5'-dGsdGsdGdGdGdAdCdGdAdTdCdGdTdCdGsdGsdGsdGsdGsdG-B' (SEQ ID NO: 1707).

DI\_A\_5167 es un ARNi corto conjugado con colesterol.

5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-s-chole -3'

3'-CsAsCAGUAGUGUGACUUAUGGUUA-5' (SEQ ID NO: 1708)

10 Después de 24 horas, se midió el IFN $\alpha$  mediante ELISA. Se determinó el nivel basal de IFN $\alpha$  para las células no tratadas, y siempre estuvo muy cerca del control que solamente tenía agua. La adición del agente de transfección solo no produjo incremento o muy poco de los niveles de IFN $\alpha$ . Se agregaron oligonucleótidos estimuladores conocidos a las células, ya sea directamente, o bien en la presencia de transfectante, y se observaron los incrementos esperados del IFN $\alpha$ . Esta disposición permite determinar la estimulación de IFN $\alpha$  en las PMBC humanas mediante el ARNi corto (u otros oligonucleótidos).

15 Aislamiento de las PMBC humanas: Se obtuvo una fracción concentrada de leucocitos (recubrimiento esponjoso) en el Blood Bank Suhl, Institute for Transfusion Medicine, Alemania. Estas células eran negativas para una variedad de patógenos, incluyendo VIH, HCV, y otros. El recubrimiento esponjoso se diluyó en proporción 1:1 con PBS, se lo agregó a un tubo que contenía Ficoll, y se centrifugó durante 20 minutos a 2.200 rpm para permitir el fraccionamiento. Ésto fue seguido por la remoción de la capa turbia de glóbulos blancos, y se la transfirió a un tubo con PBS fresco y Ficoll, que se centrifugó durante 15 minutos a 2.200 rpm. Se removió nuevamente la capa turbia de glóbulos blancos, se la transfirió a un medio de cultivo de RPMI 1640, y se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm para precipitar los glóbulos blancos. Se resuspendieron las células en RPMI, se precipitó como anteriormente, y resuspendió en el medio con FCS al 10% hasta  $1 \times 10^5$  /mL.

25 Medición de interferón- $\alpha$ : Se combinaron las células en cultivo ya sea con oligonucleótido 500 nM (o 1  $\mu$ M) en Optimem, o bien con oligonucleótido 133 nM en GP2 o en Lipofectamina 2000 o en agente de transfección DOTAP durante 24 horas a 37°C. Se midió el interferón- $\alpha$  se midió con el kit ELISA instantáneo Bender Med Systems (Viena, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La selección de las secuencias terapéuticas líder se basó en un nivel de inducción de IFN $\alpha$  de menos del 15% del control positivo.

30 **Ejemplo 3.5:** Determinación de la estabilidad del ARNi corto en el esputo de pacientes con fibrosis quística

Las muestras de esputo fueron recolectadas por el Dr. Ahmet Uluer, Children's Hospital Boston. Después de la recolección, se trataron las muestras de esputo con antibiótico, y se irradiaron con ultravioleta para reducir el contenido bacteriano. Con el objeto de determinar la estabilidad del ARNi corto en las muestras de esputo, se incubaron los ARNi corto en 30  $\mu$ L de esputo en una concentración de 5  $\mu$ M a 37°C durante los periodos indicados. 35 La reacción se terminó mediante la adición de proteinasa K, y se incubaron las muestras a 42° C durante otros 20 minutos. Se agregó una molécula de ARN de 40 mer elaborada a partir de nucleótidos L ("Spiegelmer") resistente a la degradación por la nucleasa, y sirvió como estándar de calibración. Las muestras se filtraron a través de una membrana de 0,2  $\mu$ m para remover el desecho restante. Las muestras se analizaron mediante HPLC de intercambio de iones desnaturante sobre una columna DNAPac PA 200 (Dionex) a un pH de 11,0 utilizando un gradiente de perclorato de sodio para la elución. Los ARNi corto y los productos de la degradación se cuantificaron mediante la 40 determinación del área debajo del pico para cada muestra. La concentración se normalizó hasta la concentración en las muestras no incubadas.

La selección de las secuencias terapéuticas líder (ND8356, ND8357, y ND8396) se basó en una estabilidad *in vitro* observada en el esputo con fibrosis quística con una vida media superior a 60 minutos.

45 **Ejemplo 3.6:** Verificación cruzada de las secuencias terapéuticas líder contra los polimorfismos conocidos en el gen SCNN1A humano

Con el fin de excluir los polimorfismos conocidos de los sitios objetivo de los candidatos líder, se verificaron las secuencias de ARNi corto líder contra la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/iquey.fcgi?CMD=search&DB=snp>). De los 10 polimorfismos de exones



conocidos en el gen SCNN1A humano, ninguno mostró estar presente en los sitios objetivo de cualquiera de los 10 candidatos terapéuticos líder más potentes.

**Ejemplo 3.7:** Perfilación *in vitro* de las 5 secuencias principales predichas fuera del objetivo

5 Se seleccionó una lista de alineaciones para cada secuencia mediante homología sobre la región de 19 mer. Se calificó a las secuencias fuera del objetivo con base en el número y en la posición de los malos emparejamientos de acuerdo con los criterios descritos en el Ejemplo 1. Se identificaron las 5 secuencias principales fuera del objetivo para cada una de las secuencias terapéuticas líder (ND8356, ND8357, y ND8396). Las secuencias en y fuera del objetivo se clonaron individualmente en el sistema reportero doble de luciferasa. Cada fragmento clonado abarcó los 10 19 nucleótidos objetivo además de la región de flaqueo de 10 nucleótidos, tanto 5' como 3' de la secuencia objetivo. Se clonaron los fragmentos en múltiples sitios de clonación 3' con la secuencia de luciferasa de Renilla, bajo el control de un promotor SV40. La actividad de cada ARNi corto contra ambas secuencias en y fuera del objetivo se determinó mediante la fluorescencia relativa de la luciferasa objetivo de Renilla con la luciferasa de luciérnaga, siendo ésta última controlada independientemente por el promotor HSV-TK. Inicialmente, se llevaron a cabo las transfecciones en células COS-7 con una concentración de ARNi corto de 50 nM. Las lecturas de luciferasa se tomaron a las 24 horas después de la transfección. Con esta alta concentración de ARNi corto, no se observó ninguna desactivación genética de más del 30% contra cualquier secuencia fuera del objetivo para cualquiera de los tres ARNi corto líder. La actividad contra la secuencia en el objetivo se demostró con una reducción relativa en la actividad de luciferasa de Renilla de aproximadamente el 80%. También se generaron las curvas de IC50 para cada ARNi corto contra la secuencia en el objetivo, y se controlaron con las secuencias fuera del objetivo identificadas 20 anteriormente. Para cada ARNi corto líder, las IC50 en el objetivo en este ensayo reportero, fueron de un orden de magnitud similar (de 10 a 50 pM) a las IC50 obtenidas contra el objetivo endógeno en H441 (Ejemplo 3.3), indicando que para ND8356, ND8357, y ND8396, la potencia contra la secuencia en el objetivo fue al menos de 1.000 a 5.000 veces más alta que para cualquiera de las secuencias predichas fuera del objetivo.

**Ejemplo 3.8:** Perfilación de genotoxicidad

- 25 1. Determinación de la citotoxicidad: La citotoxicidad se determinó utilizando un contador de células para la evaluación del número de células en cultivo.
- 30 2. Es bien sabido que la prueba de las concentraciones citotóxicas *in vitro* puede inducir a efectos genotóxicos, tales como la formación de micronúcleos. Por consiguiente, se consideró que cantidades crecientes de células que contenían micronúcleos que aparecían en los recuentos celulares de alrededor del 50% o menos (comparado con el control negativo concurrente) estaban relacionados con la citotoxicidad, si no se podía observar ya un incremento dependiente de la dosis en las células micronucleadas con concentraciones que mostraran una toxicidad moderada cuando mucho. Se requiere el análisis de una concentración que muestre al menos 50% de reducción en el recuento de células por los lineamientos que regulan los ensayos celulares de mamífero *in vitro* (OECD, y los lineamientos de ICH para la conducción de la prueba de aberración de cromosomas). Además, los protocolos de OECD requieren de 35 la prueba de compuestos no tóxicos para incluir al menos una concentración precipitante (siempre que ésta no exceda de 10 mM o 5 mg/mL, lo que sea más bajo). Debido a que la prueba de micronúcleos *in vitro* tiene como objetivo predecir el resultado de los ensayos reguladores, es decir, la prueba de aberración cromosómica *in vitro*, el protocolo para la prueba de micronúcleos *in vitro* se diseñó para satisfacer los requerimientos para estas pruebas.
- 40 3. Sistema de prueba: Las células TK6 son células transfectadas con el virus de Epstein-Barr y células inmortalizadas (origen linfoblastoide humano derivado del bazo). 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 (previamente tratadas con Aroclor 1254). Tiempo de tratamiento: 20 horas (-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 analizaron al menos tres concentraciones (2 cultivos por concentración), y 2.000 45 células por concentración.
4. El efecto inductor de micronúcleo para una concentración probada se consideró positivo si la frecuencia de las células micronucleadas era:
- > 2%, y mostraba al menos una duplicación del valor de control de solvente concurrente, O
  - < 2% y mostraba al menos un aumento de tres veces sobre el valor de control de solvente concurrente.
- 50 5. Para concluir que un experimento es positivo, se tiene que tomar en cuenta la relación dosis-efecto y la citotoxicidad.
- 6.

7. Resumen: Las secuencias terapéuticas líder ND8396, ND8356, ND8357 no indujeron mayores números de células conteniendo micronúcleos después del tratamiento durante 20 horas sin activación metabólica, ni después del tratamiento de 3 horas con o sin S9. No se pudo analizar ninguna concentración citotóxica hasta el límite de prueba de 5 mg/mL.

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

10 Con el objeto de demostrar la eficacia funcional *in vitro* del ARNi corto líder contra alfa-ENaC, se transfectaron las células H441 con el ARNi corto, y se prepararon para el análisis de la cámara Ussings de transporte de iones. Para la transfección, se sembraron en placa las células H441 en matraces T25 a razón de  $2 \times 10^6$  células por matraz, en un medio de cultivo complementado con dexametasona 200 nM. Se transfectaron las células de cada matraz ya sea con ND8396, o bien con un ARNi corto de control no de direccionamiento, en ARNi corto 30 nM y 4  $\mu$ L/mL de Lipofectamina 2000 en un volumen total de 5 mL (medio sin suero). Un día después de la transfección, se sembraron en placa las células sobre insertos Snapwell de 1  $\text{cm}^2$  hasta confluencia ( $2 \times 10^5$  células por inserto), para minimizar el tiempo requerido para la diferenciación y la formación de uniones apretadas, y se suministraron con el medio tanto en la cámara apical como en la cámara basolateral. Después de un día de cultivo adicional, se removió el medio apical, y se reemplazó el medio basolateral, llevando de esta manera a las células al cultivo de interfase aire-liquido (ALI). Las células se mantuvieron en la ALI durante 6 días adicionales antes del análisis de transporte de iones.

20 8. Para el análisis funcional en las cámaras Ussings, se montaron los insertos Snapwell en Cámaras de Difusión Vertical (Costar), y se bañaron con solución de Ringer continuamente gasificada ( $\text{CO}_2$  al 5% en  $\text{O}_2$ ; pH 7,4) mantenida a 37°C, conteniendo: NaCl 120 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,3 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,8 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM, y glucosa 10 mM. Se determinó la osmolaridad de la solución dentro del intervalo de 280 a 300 mosmoles/kg de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se sujetaron las células al voltaje a 0 mV (modelo EVC4000; WPI). Se midió la resistencia transepitelial ( $R_T$ ) aplicando 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 se calculó la  $R_T$  mediante la ley de Ohm. Se registraron los datos utilizando una estación de trabajo PowerLab (ADInstruments). Después del tratamiento con el ARNi corto, se registraron las características basales de las células, y la corriente de corto circuito sensible a la amilorida ( $I_{SC}$  en seguida de la aplicación de amilorida 10  $\mu$ M; lado apical solamente). Se determinó la actividad del canal de ENaC en cada cultivo mediante la  $I_{SC}$  sensible a la amilorida en cada caso.

25 9. En seguida del ensayo, se lisaron las células sobre los insertos individuales para el análisis del ARN. Una desactivación genética del 75% al nivel del ARN en el momento del ensayo (ND8396, comparado con el control sin direccionamiento) se correlacionó con una desactivación genética funcional de la corriente sensible a amilorida de aproximadamente el 30% (ND8396 comparado con el control sin direccionamiento).

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

35 Tabla A: Abreviaturas de monómeros de nucleótidos utilizados en la representación de la secuencia de ácido nucleico. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están mutuamente enlazados por enlaces de fosfodiéster 5'-3'.

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

5 Tabla 1A: ARNi corto seleccionados en el conjunto de cribado inicial (ARNi corto de reactividad cruzada de alfa-ENaC de humano-Rhesus). Se identificaron un total de 152 secuencias de ARNi como un conjunto de cribado inicial, tanto con (cadenas de secuencias 1-304) como sin (cadenas de secuencias 305-608) modificación de la estructura base. Las secuencias de ARNi se diseñaron para ser completamente complementarias para ambas secuencias de alfa-ENaC humana y de mono Rhesus, 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 una sola dosis independientes (haga referencia a la sección de ejemplos para ver los métodos empleados).

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8285	1	AGcccGuAGcGuGGccuccTsT	2	GGAGGcAcCGcCuACGGGGCUTsT	92%	4%	114%	15%
ND8286	3	ccGGGuAAuGGuGcAcGGGTsT	4	CCCGUGcAcAUuACCCGGTsT	60%	1%	84%	4%
ND8287	5	AuGcuAucGcGAcGAAcATsT	6	UGUUCUGUCGCGAuAGcAUTsT	27%	2%	35%	3%
ND8288	7	uGcuAucGcGAcGAAcAAATsT	8	UUGUUCUGUCGCGAuAGcATsT	23%	1%	32%	4%
ND8289	9	GcccGuuuAuGuAuGcuccTsT	10	GGAGcAuAcAuAAACGGGGTsT	64%	2%	93%	8%
ND8290	11	GcccGuAGcGuGGccuccATsT	12	UGGAGGcAcCGcCuACGGGGTsT	83%	2%	115%	5%
ND8291	13	ccGGAAuuAAAAGAGGAGcTsT	14	GCUCUCUuuAAUUCGGTsT	54%	2%	79%	10%
ND8292	15	ccGAAAGGuuccGAAAGccGATsT	16	UCGGCUUCGGAAACCUUCGGTsT	40%	1%	54%	8%
ND8293	17	GcAAuucGGccuGcuuuucTsT	18	GAAAAGcAGGCCGAAUUGTsT	41%	2%	51%	4%
ND8294	19	GGcGAAuuAcucucAcuucTsT	20	GAAGUGAGAGuAAUUCGGTsT	19%	1%	25%	5%
ND8295	21	GcGAAuuAcucucAcuucTsT	22	GGAAGUGAGAGuAAUUCGGTsT	19%	5%	20%	1%
ND8296	23	AaccAGGcGAAuuAcucucTsT	24	GAGAGuAAUUCGCCUGGUUUsT	92%	4%	115%	19%
ND8297	25	GGuAAuGGuGcAcGGGcAGTsT	26	CUGCCCGUGcAcAuAACCTsT	79%	2%	104%	14%
ND8298	27	cucAcGAuGGccucGGuGTsT	28	cACCGAGGGcAcUUCGUGAGTsT	61%	3%	97%	14%
ND8299	29	GcuccGAAAGGuuccGAAGTsT	30	GCUUCGGAACCUUCGGAGTsT	16%	2%	19%	3%
ND8300	31	GcccGAuAcuGGucuccAGGTsT	32	CCUGGAGAcAcAuAUCGGTsT	50%	5%	55%	5%
ND8301	33	ccGAuAcuGGucuccAGGTsT	34	GCCUGGAGAcAcAuAUCGGTsT	53%	2%	65%	6%
ND8302	35	uGcuGuuGcAccAuAcuuuTsT	36	AAAuAUGGUGcAAcAGcATsT	19%	1%	25%	3%

(continuación)

ID del Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8303	37	AACGGGucuGucccuGauGcTsT	38	GcAUcAGGGAcAGACCCGUUTsT	90%	3%	96%	11%
ND8304	39	uuAAcuuGcGGccuGGcGuTsT	40	ACGCcAGGCCGcAAGUuAAATsT	97%	3%	101%	11%
ND8305	41	GcuGGuuAcucAcGauGGcTsT	42	GCcAUCGUGAGuAACcAGCTsT	73%	2%	78%	7%
ND8306	43	uuAcucAcGauGGccucGTsT	44	CGAGGGCCuAUCGUGAGuAAATsT	91%	7%	93%	6%
ND8307	45	GAAGccGauAcuGGucuccTsT	46	GGAGAcCAGuAUCGGCUUCTsT	71%	3%	73%	6%
ND6308	47	GAuAcuGGucuccAGGccGTsT	48	CGGCCUGGAGAcCAGuAUCTsT	86%	1%	90%	9%
ND8309	49	AuAcuGGucuccAGGccGATsT	50	UCGGCCUGGAGAcCAGuAUTsT	71%	5%	70%	8%
ND8310	51	cAAcGGucGuccuGauGTsT	52	cAUcAGGGAcAGACCCGUUGTsT	80%	2%	84%	9%
ND8311	53	uuuAAcuuGcGGccuGGcGTsT	54	CGCcAGGCCGcAAGUuAAATsT	95%	2%	107%	15%
ND8312	55	uAcucAcGauGGccucGGTsT	56	CCGAGGGCCuAUCGUGAGuATsT	44%	2%	97%	9%
ND8313	57	uuucGGAGAGuAcuucAGcTsT	58	GCUGAAGuACUCUCCGAAATsT	14%	2%	16%	2%
ND8314	59	GcAGAcGcuuuuGAccuGTsT	60	cAGGUcAAAGAGCGUCUGCTsT	55%	4%	58%	5%
ND8315	61	cuAcAucuuuAuccGcGGTsT	62	CCGGGGuAGAAGAUAGTsT	20%	3%	26%	4%
ND8316	63	AGGcGAuuuAcucucAcuuTsT	64	AAGUGAGAGuAAUUCGCCUTsT	24%	1%	25%	2%
ND8317	65	ccGcuucAaccAGGucuccTsT	66	GGAGCCUGGUUGAAGCGGTsT	62%	5%	64%	4%
ND8318	67	cAAccGcAuGAAGAcGGccTsT	68	GGCCGUCUuAUGCGGUUGTsT	54%	6%	54%	4%
ND8319	69	AuGAAGAcGGccuucGGTsT	70	CCcAGAAGCCCGUCUuCAUTsT	44%	4%	44%	6%
ND8320	71	AGcAcAAccGcAuGAAGAcTsT	72	GUCUuAUGCGGUUGUGCUTsT	15%	1%	16%	1%
ND8321	73	ucGAGuuccAccGcuuccuATsT	74	uAGGAGCGGUUGGAACUCGATsT	85%	5%	89%	13%
ND8322	75	cuGcuucuAccAGAcAuAcTsT	76	GuAUGUCUGGuAGAAGcAGTsT	46%	4%	44%	3%
ND8323	77	GAGGGAGuGGuAccGcuuccTsT	78	GAAGCGGuACCuCCCUUCTsT	60%	7%	56%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8324	79	ccuuuAuGGAuGGuGGTsT	80	CcAcCauCUCcAuAAAGGTsT	83%	9%	82%	1%
ND8325	81	uGAGGGAGuGGuAccGcuuTsT	82	AAGCGGuAcAcUCcCUCcATsT	77%	6%	72%	2%
ND8326	83	ccuGcAAaccAGGcGAAuuATsT	84	uAAUUCGGCCUGGUUGcAGGTsT	41%	4%	44%	7%
ND8327	85	GGccuGGcGuGGAGAccucTsT	86	GAGGUcUCcACGcCcAGGCCTsT	101%	5%	95%	4%
ND8328	87	uGcuuuucGGAGAGuAcuuTsT	88	AAGuAcUCUCcCGAAAAAGcATsT	36%	1%	29%	2%
ND8329	89	cccGuAGcGuGGccuccAGTsT	90	CUGGAGGcCAGcCuACGGGTsT	52%	1%	51%	2%
ND8330	91	ccGuAGcGuGGccuccAGcTsT	92	GCUGGAGGcCAGcCuACGGTsT	86%	9%	84%	3%
ND8331	93	ccAGGcGAAuuAcucucAcTsT	94	GUGAGAGuAAUUCGCCUUGGTsT	15%	2%	13%	1%
ND8332	95	GAAAcuGcuAuAcuuucAAATsT	96	UUGAAAAGuAuAGcAGUUUUCTsT	10%	1%	10%	1%
ND8333	97	GcccGGGuAAuGGuGcAcGcTsT	98	CGUGcAcAuAACCCGGGCTsT	83%	6%	82%	4%
ND8334	99	cccGGGuAAuGGuGcAcGcTsT	100	CCGUGcAcAuAACCCGGGCTsT	56%	4%	71%	10%
ND8335	101	cGGGuAAuGGuGcAcGGGcTsT	102	GCCCCGUGcAcAuAACCCCGTsT	42%	3%	91%	8%
ND8336	103	GGGuAAuGGuGcAcGGGcATsT	104	UGCCCCGUGcAcAuAACCCCTsT	65%	5%	71%	7%
ND8337	105	uAAuGGuGcAcGGGcAGGATsT	106	UCCUGCCCCGUGcAcAuATsT	46%	3%	46%	4%
ND8338	107	cuGGuuAcucAcGGuGGccTsT	108	GGcAuCGUGAGuAACcAGTsT	74%	5%	79%	10%
ND8339	109	GuuAcucAcGGuGGccuccTsT	110	GAGGGcAuCGUGAGuAACTsT	85%	6%	92%	8%
ND8340	111	uGucAcGGuGGuAcuccucTsT	112	GAGGGUGAcAuCGUGAcATsT	85%	4%	74%	5%
ND8341	113	uGcuuccGAAAGGuuuccGAAGTsT	114	CUUCGGAAACCUUCGGAGcATsT	37%	2%	32%	3%
ND8342	115	uccGAAAGGuuuccGAAGccGcTsT	116	CGGCUUCGGAAACCUUCGGATsT	60%	4%	47%	5%
ND8343	117	uuuccGAAAGcGGuAcuGGGuTsT	118	ACcAGuAUCGGCUUCGGAAATsT	15%	1%	13%	2%
ND8344	119	AGccGGuAcuGGuuccuccAGTsT	120	CUGGAGAcAGuAUCGGCUUcTsT	49%	3%	41%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8345	121	cuuGGuAcuGccucuGAAcTsT	122	GUUcAGAGGcAGuACcAAgTsT	55%	2%	47%	4%
ND8346	123	cucccGuAGcAcAcuAuAAATsT	124	UuAuAGUGUGCuACGGGAGTsT	67%	3%	57%	5%
ND8347	125	ucccGuAGcAcAcuAuAAcTsT	126	GUuAuAGUGUGCuACGGGATsT	29%	1%	26%	3%
ND8348	127	uGcAccAuAcuuucuuGuATsT	128	uAcAAGAAAGuAUGGUGcATsT	17%	1%	15%	3%
ND8349	129	uuGccccGuuuAuGuAuGcuTsT	130	AGcAuAcAuAAACGGGGcAAATsT	68%	2%	50%	4%
ND8350	131	uGccccGuuuAuGuAuGcuTsT	132	GAGcAuAcAuAAACGGGGcATsT	59%	8%	44%	6%
ND8351	133	GGAcccuAGAcccuGcAGTsT	134	CUGcAGAGGUCuAGGGUCCTsT	86%	11%	82%	2%
ND8352	135	ccuAGAcccuGcAGccccATsT	136	UGGGCUGcAGAGGUCuAGGTsT	69%	7%	79%	3%
ND8353	137	uGGcAuGAuGuAcuGGcAAATsT	138	UUGCcAGuAcAuAUGCcATsT	58%	4%	52%	4%
ND8354	139	uAcuGGcAAuucGGccuGcTsT	140	GcAGCCGAAUUGCcAGuATsT	101%	4%	100%	4%
ND8355	141	AAuucGGccuGcuuuucGGTsT	142	CCGAAAAAGcAGGCCGAAUUTsT	49%	1%	43%	6%
ND8356	143	cuGcuuuucGGAGAGuAcuTsT	144	AGuACUCUCCGAAAAAGcAGTsT	17%	3%	16%	1%
ND8357	145	uucGGAGAGuAcuucAGcuTsT	146	AGCUGAAGuACUCUCCGAAATsT	13%	3%	16%	2%
ND8358	147	AGcAGAcGcucuuuGaccuTsT	148	AGGUcAAAAGAGCGUCUGCUTsT	73%	9%	71%	5%
ND8359	149	cuuGcAGcGccuGAGGGucTsT	150	GACCCUcAGCGCUGcAAGTsT	57%	9%	64%	7%
ND8360	151	uGGcuuuAAcuuGcGGccuTsT	152	AGGCCGcAAGUuAAAGCcATsT	102%	12%	106%	10%
ND8361	153	GcuuuAAcuuGcGGccuGGTsT	154	CcAGGCCGcAAGUuAAAGCTsT	83%	5%	62%	8%
ND8362	155	uAAcuuGcGGccuGGcGuGTsT	156	cACGcAGGCCGcAAGUuATsT	119%	2%	115%	6%
ND8363	157	AccuuuAcccuuAcAAAGuATsT	158	uACUUUGAAGGGGuAAAGGUTsT	17%	3%	13%	2%
ND8364	159	GGuuAcucAcGAuGGccuTsT	160	AGGGCcAUCUGUGAGuAACCTsT	104%	9%	117%	17%
ND8365	161	cAcGAuGGccuGGuGAcTsT	162	GUcACCGAGGGCcAUCGUGTsT	140%	13%	100%	9%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del primer cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8366	163	AGAuGcuAucGcGAcAGAAATsT	164	UUCUGUCGCGAuAGcAUCUTsT	46%	2%	70%	6%
ND8367	165	AcGAuGGucAccuccuGuTsT	166	AcAGGAGGGUGACcAUCGUTsT	85%	6%	128%	10%
ND8368	167	cuccGAAAGGuuccGAAAGccTsT	168	GGCUUCGGAAACCUUCGGAGTsT	12%	2%	18%	1%
ND8369	169	AAGGuuccGAAAGccGAuAcTsT	170	GuAUCGGCUUCGGAAACCUUTsT	63%	7%	114%	19%
ND8370	171	GGuAcuGccuccuGAAAcAcuTsT	172	AGUGUUCAGAGGcAGuACCTsT	36%	3%	71%	6%
ND8371	173	AGcuuuGAcAAGGAACuuuTsT	174	AAAGUUCUUUGUcAAAAGCUTsT	17%	1%	21%	1%
ND8372	175	uuuGAcAAGGAACuuuuccuTsT	176	AGAAAAGUUCUUUGUcAAAATsT	16%	2%	26%	4%
ND8373	177	uGAcAAGGAACuuuuccuAAATsT	178	UuAGGAAAAGUUCUUUGUcATsT	12%	1%	22%	5%
ND8374	179	cccGuAGcAcAcuAAcATsT	180	UGUuAuAGUGUGcUACGGGTsT	41%	2%	75%	3%
ND8375	181	cAcuAuAAcAucuGcuGGATsT	182	UCcAGcAGAUJUuAuAGUGTsT	17%	1%	26%	2%
ND8376	183	uuGcuGuuGcAccAuAuuTsT	184	AAGuAUGGUGcAAcAGcAAATsT	45%	4%	69%	6%
ND8377	185	GuAcuGGcAAuuuGGccuGTsT	186	cAGGCCGAAUUGCcAGuACTsT	60%	6%	120%	8%
ND8378	187	uuGGccuGcuuuuGGAGTsT	188	CUCGAAAAGcAGGCCGAAATsT	57%	5%	86%	11%
ND8379	189	ccuGcuuuuGGGAGAGuAcTsT	190	GuACUCUCCGAAAAGcAGGTsT	43%	5%	50%	3%
ND8380	191	GcuuuuGGGAGAGuAcuuTsT	192	GAAGuACUCUCCGAAAAGCTsT	16%	2%	24%	2%
ND8381	193	cuuuuGGGAGAGuAcuuAcTsT	194	UGAAGuACUCUCCGAAAAGTsT	12%	1%	16%	3%
ND8382	195	cAAccucAAcucGGAcAAGTsT	196	CUUGUCCGAGUUUGAGGUUGTsT	33%	2%	39%	3%
ND8383	197	cuAccAGAcAuAcuAucATsT	198	UGAUGAGuAUGUCUGGUAGTsT	13%	1%	23%	6%
ND8384	199	cuGucGAGGcuGccAGAGATsT	200	UCUCUGGcAGCCUCCGAcAGTsT	11%	1%	18%	3%
ND8385	201	AAAcuGcuAuAcuuuAAuTsT	202	AUUAAAAGuAuAGCAGUUUUsT	48%	8%	64%	11%
ND8386	203	GGcuuuAAcuuGcGGccuGTsT	204	cAGGCCGcAAAGUuAAAAGCCTsT	55%	7%	70%	8%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8387	205	cuuuAacuuGcGGccuGGcTsT	206	GcAGCCcGcAAGUuAAAAGTsT	40%	11%	87%	14%
ND8388	207	AGGuGuAuucAcuccuGTsT	208	cAGGAGUGAAuAcAcCCUTsT	45%	3%	41%	5%
ND8389	209	AcGAuGGccucGGuGAcATsT	210	UGUcACCGAGGGCCcAUCGUTsT	43%	2%	60%	9%
ND8390	211	cuGAACAcucuGGuuuccTsT	212	GGAAACcAGAGUGUuAcAGTsT	33%	2%	48%	11%
ND8391	213	cuAuAAcAucuGcuGGAGuTsT	214	ACUCcAGcAGAUGUuAuAGTsT	16%	1%	17%	4%
ND8392	215	GcAccAuAcuuucuuGuAcTsT	216	GuAcAAGAAAAGuAUGGUGCTsT	19%	1%	22%	4%
ND8393	217	uGucuAGcccAucAuuccuGTsT	218	cAGGAUGAUGGGcCuAGAcATsT	69%	3%	92%	15%
ND8394	219	AGGaccuAGAccucuGcATsT	220	UGcAGAGUcUcAGGGUCCUTsT	94%	5%	86%	13%
ND8395	221	ccAccGcuuccuAccGAGATsT	222	CUCUCGGuAGGAGCGGUGGTsT	55%	1%	65%	6%
ND8396	223	uAccGAGAGcucucGAGuTsT	224	ACUCGAAGAGCUCUCGGuATsT	11%	1%	11%	1%
ND8397	225	AAcAuuccuGucGAGGcuGcTsT	226	GcAGCCUCGAcAGGAUGUUTsT	90%	7%	72%	11%
ND8398	227	GAAccuuuAcccuucAAAGTsT	228	CUUUGAAGGGuAAAGGUUcTsT	22%	2%	25%	4%
ND8399	229	GGuuccGAAgGccGauAcuGTsT	230	cAGuAUCGGCUcCGGAACCTsT	93%	9%	89%	9%
ND8400	231	AAGccGauAcuGGucuccATsT	232	UGGAGAcAGuAUCGGCUUUTsT	35%	2%	42%	9%
ND8401	233	ucuAGcccAucAuuccuGcuTsT	234	AGcAGGAUGAUGGGcCuAGATsT	95%	8%	95%	14%
ND8402	235	cGGcGccAuccGccuGGuGTsT	236	cACcAGGGGAUGGGCCCGTsT	81%	8%	89%	17%
ND8403	237	uuuucGGAGAGuAcuucAGTsT	238	CUGAAuAcUCUCcCGAAAAATsT	13%	1%	13%	1%
ND8404	239	GAGAGuAcuucAGcuAcccTsT	240	GGGuAGCUGAAGuAcUCUCTsT	71%	3%	100%	10%
ND8405	241	GAcGcuuuuGAccuGcuAcTsT	242	GuAcAGGUcAAAAGAGCGUcTsT	84%	5%	92%	13%
ND8406	243	uGuGuAuucAcuccuGcuuTsT	244	AAGcAGGAGUGAAuAcAcATsT	78%	2%	89%	8%
ND8407	245	AAcAAcAAGAGAAuGGAGTsT	246	CUCcAUUUCUCUUGUUGUUTsT	66%	3%	88%	21%

continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8408	247	AuuGAAGGAuGuGcAGGGcTsT	248	GCCCUgCAuUCCUUAATsT	25%	1%	36%	6%
ND8409	249	ucucAGAGccGcccAAAcuTsT	250	AGUUUGGGCGGCUCUGAGATsT	18%	1%	24%	2%
ND8410	251	AAAcAAAccAAGGGuAcATsT	252	UGuACCCUUGGUUGUGUUUJsT	21%	1%	35%	2%
ND8411	253	uAcccGuGccccuAcAGAGTsT	254	CUCUGUGAGGGcACGGGuATsT	57%	2%	67%	4%
ND8412	255	uAGcAcAcuAuAAcAuucuGTsT	256	cAGAUGUuAuAGUGUGCuATsT	30%	2%	41%	1%
ND8413	257	GGuGuAuucAcuccuGcTsT	258	GcAGGAGUGAAuAcAcCTsT	73%	1%	90%	9%
ND8414	259	cAuGaucAAGGAGuGuGcTsT	260	GcAcACUCCUUGAUcAUGTsT	65%	2%	67%	5%
ND8415	261	AcucAcGauGGccucGGuTsT	262	ACCGAGGGcAUcGUGAGUJsT	96%	6%	95%	6%
ND8416	263	GGAGcuuuGAcAAGGAAcuTsT	264	AGUUCUUGUcAAAGCUCCTsT	24%	1%	28%	4%
ND8417	265	AuAcccGuGccccAcAGATsT	266	UCUGUGAGGGcACGGGuAJsT	54%	1%	62%	2%
ND8418	267	GGAGuGGccAAAGucAAcATsT	268	UGUUGACUUUGGcCACUCCTsT	93%	2%	86%	11%
ND8419	269	AAcuAcAAAAccAAuuucuGTsT	270	cAGAAUUGUUUUGuAGUUsT	101%	5%	108%	19%
ND8420	271	uGcuGGAGuGuuGcuGuuGTsT	272	cAAcAGcAAcACUCcAGcATsT	29%	1%	26%	1%
ND8421	273	AGGucucuGcAAccAGGcTsT	274	GCCUUGUUGcAGGAGACCUsT	95%	10%	91%	17%
ND8422	275	cuuuGGcAuGauGuAcuGGTsT	276	CcAGUAcAUcAUGCcAAAGTsT	86%	3%	84%	6%
ND8423	277	cAucuGcAcccucAAuccTsT	278	GGGAUUGAGGGUGcAGAUGTsT	82%	11%	73%	4%
ND8424	279	cGAcuGcAccAAAGAAuGGcTsT	280	GcAAUUCUUGGUGcAGUCGTsT	70%	8%	69%	7%
ND8425	281	AAAAcAAAccAAGGGuAcTsT	282	GuACCCUUGGUUGUGUUUJsT	95%	6%	106%	12%
ND8426	283	cAucuGcuGGAuGuuGcuTsT	284	AGcAAcACUCcAGcAGAUGTsT	30%	2%	37%	1%
ND8427	285	ccuAcAucuucuAuuccGcTsT	286	CGCGGAuAGAAGAUGuAGGTsT	42%	6%	30%	1%
ND8428	287	GccuAcAucuucuAuuccGcTsT	288	GCGGAuAGAAGAUGuAGGCTsT	65%	7%	54%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8429	289	GAGuGGuAccGcuuccAcuTsT	290	AGUGGAAGCGGuACcACUCtTsT	95%	11%	86%	19%
ND8430	291	GGuAccGcuuccAcuAcuTsT	292	AUGuAGUGGAAGCGGuACcTtsT	111%	19%	96%	14%
ND8431	293	GuGGuAccGcuuccAcuAcTsT	294	GuAGUGGAAGCGGuACcACTsT	98%	13%	52%	26%
ND8432	295	GAuuuAcucucAcuuccAcTsT	296	GUGGAAGUGAGAGuuAAUUCtTsT	111%	21%	73%	27%
ND8433	297	AAuuuAcucucAcuuccAccTsT	298	GGUGGAAGUGAGAGuuAAUUtTsT	109%	22%	105%	7%
ND8434	299	uAcucucAcuuccAccAccTsT	300	GGUGGUGGAAUGAGAGuATsT	106%	23%	95%	7%
ND8435	301	AGuGGuAccGcuuccAcuATsT	302	uAGUGGAAGCGGuACcACUtTsT	109%	18%	102%	9%
ND8436	303	GGGcAAcuucAucuucGccTsT	304	GCGGAAGAUGAAUGUCCCTsT	109%	18%	107%	14%
ND-8501	305	AGCCCGUAGCGUGGCCUCCTsT	306	GGAGGCCACGCuACGGGCUtTsT	84%	14%	69%	3%
ND-8502	307	CCGGGUAAUGGUACACGGGTsT	308	CCCGUGCACCAUUACCCGGTtsT	41%	6%	30%	2%
ND-8503	309	AUGCUAUCGGCGACAGAACAtsT	310	UGUUCUGUCGGCGAUAGCAUtTsT	11%	2%	10%	2%
ND-8504	311	UGCUAUCGGCGACAGAACAAtsT	312	UUGUUCUGUCGGCGAUAGCATsT	15%	2%	10%	0%
ND-8505	313	GCCCGUUUAUGUAUGCUCCTsT	314	GGAGCAUACAUAACCGGGCTsT	23%	3%	16%	1%
ND-8506	315	GCCCGUAGCGUGGCCUCCATsT	316	UGGAGGCCACGCuACGGGCTtsT	32%	3%	22%	1%
ND-8507	317	CCGAAAUJAAAGAGGACTsT	318	GCUCUCUUUAUUUCCGGTtsT	35%	4%	24%	1%
ND-8508	319	CCGAAGGUUCCGAAGCCGATsT	320	UCGGCUUCGGAAACCUUCGGTtsT	19%	2%	13%	1%
ND-8509	321	GCAAUUCGGCCUGCUUUUCtTsT	322	GAAAAGCAGGCCGAAUUGCTsT	12%	1%	8%	1%
ND-8510	323	GGCGAAUUACUCUCACUUCtTsT	324	GAAGUGAGAGUAUUUCGCCTsT	21%	2%	18%	1%
ND-8511	325	GCGAAUUACUCUCACUUCCTsT	326	GGAAGUGAGAGUAUUUCGCCTsT	12%	2%	8%	1%
ND-8512	327	AACCAGCGGAAUUACUCUCtTsT	328	GAGAGUAUUUCGCCUGGUUtTsT	99%	11%	79%	5%
ND-8513	329	GGUAAUGGUGCACGGGCAGTtsT	330	CUGCCCGUGCACCAUJACCTsT	61%	6%	42%	4%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8514	331	CUCACGAUGGCCUUCGGUGTsT	332	CACCGAGGCCCAUCGUGAGTsT	94%	11%	70%	4%
ND-8515	333	GCUCCGAAGGUUCCGAAGTsT	334	GCUUCGGAACCUUCGGAGTsT	18%	2%	17%	2%
ND-8516	335	GCCGAUACUGGUCUCCAGGTsT	336	CCUGGAGACCAGUAUCGGTsT	14%	1%	12%	1%
ND-8517	337	CCGAUACUGGUCUCCAGGTsT	338	GCCUGGAGACCAGUAUCGGTsT	42%	5%	33%	2%
ND-8518	339	UGCUGUUGCACCAUACUUUsT	340	AAAGUAUGGUGCAACAGCATsT	10%	1%	9%	0%
ND-8519	341	AACGGUCUGUCCUUGAUGTsT	342	GCAUCAGGGACAGACCGUUsT	60%	7%	52%	8%
ND-8520	343	UUAAUUUGCGGCCUUGCGUsT	344	ACGCCAGGCCGCAAGUUAAsT	82%	25%	77%	18%
ND-8521	345	GCUGGUUACUCACGAUGGTsT	346	GCCAUCGUGAGUAACCGTsT	36%	4%	34%	7%
ND-8522	347	UUACUCACGAUGGCCUUCGTsT	348	CGAGGCCAUCGUGAGUAAsT	105%	21%	113%	21%
ND-8523	349	GAAGCCGAUACUGGUCUCCTsT	350	GGAGACCAGUAUCGGCUUCTsT	24%	2%	18%	2%
ND-8524	351	GAUACUGGUCUCCAGGCCGTsT	352	CGGCCUGGAGACCAGUAUCTsT	30%	5%	25%	3%
ND-8525	353	AUACUGGUCUCCAGGCCGATsT	354	UCGGCCUGGAGACCAGUAUsT	12%	1%	11%	2%
ND-8526	355	CAACGGUUCUGUCCUUGAUGTsT	356	CAUCAGGGACAGACCGUUGTsT	24%	7%	24%	2%
ND-8527	357	UUUAACUUUGCGGCCUUGCGTsT	358	CGCCAGGCCGCAAGUUAAsT	122%	6%	107%	9%
ND-8528	359	UACUCACGAUGGCCUUCGGTsT	360	CCGAGGCCCAUCGUGAGUAUsT	78%	6%	84%	7%
ND-8529	361	UUUCGGAGAGUAUCUACAGTsT	362	GCUGAAGUAUCUCCGAAAsT	87%	18%	80%	17%
ND-8530	363	GCAGACGCUCUUUGACCUUGTsT	364	CAGGUCAAAAGAGCCUUGTsT	14%	2%	13%	0%
ND-8531	365	CUACAUCUUCUAUCCGGCGTsT	366	CCCGGAUAAGAAGUAUGTsT	20%	4%	18%	3%
ND-8532	367	AGCGAAUUACUCUCACUUUsT	368	AAGUGAGAGUAUUCCGCCUsT	25%	5%	18%	1%
ND-8533	369	CCGCUUCAACCAGGUCUCCTsT	370	GGAGACCUUGUUAAGCGGTsT	30%	11%	22%	2%
ND-8534	371	CAACCGCAUGAAGACGGCCTsT	372	GGCCGUCUUAUCGCGGUUGTsT	33%	4%	23%	1%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8535	373	AUCAAGACGGCCUUCUGGGTsT	374	CCCAGAAGCCGUCUUAUTsT	114%	12%	84%	15%
ND-8536	375	AGCACAACCGCAUGAAGACTsT	376	GUCUUCAUGCGGUUGUGCUTsT	18%	1%	16%	3%
ND-8537	377	UCGAGUUCACCACCGCUCCUAUsT	378	UAGGAGCGGUGGAACUCGATsT	25%	0%	26%	3%
ND-8538	379	CUGCUUCUACCAGACAUACTsT	380	GUAUGUCUGGUAAGAAGCAGTsT	12%	1%	13%	2%
ND-8539	381	GAGGGAGUGGUACCGCUUCTsT	382	GAAAGCGGUACCCUUCTsT	43%	1%	47%	14%
ND-8540	383	CCUUUAUGGAUGAUGGGTsT	384	CCACCAUCAUCCAUAAAAGTsT	61%	5%	60%	8%
ND-8541	385	UGAGGGAGUGGUACCGCUUTsT	386	AAGCGUACCCACUCUCCUCATsT	36%	5%	35%	5%
ND-8542	387	CCUGCAACAGCGGAAUUAUsT	388	UAAUJGCGGUGGUUGCAGGTsT	19%	2%	16%	1%
ND-8543	389	GGCCUGCGUGGAGACCUCTsT	390	GAGGUCUCCACGCCAGGCCTsT	28%	7%	20%	2%
ND-8544	391	UGCUIUUCGGAGAGUAUUTsT	392	AAGUACUCUCCGAAAAGCATsT	22%	5%	17%	1%
ND-8545	393	CCCGUAGCGUGGCCUCCAGTsT	394	CUGGAGGCCACGCUACGGGTsT	25%	3%	22%	2%
ND-8546	395	CCGUAGCGUGGCCUCCAGTsT	396	GCUGGAGGCCACGCUACGGTsT	62%	5%	57%	9%
ND-8547	397	CCAGGCGAAUACUCUCACTsT	398	GUGAGUAUUUCGCCUGGTsT	23%	11%	16%	2%
ND-8548	399	GAAACUGCUAUACUUUCAATsT	400	UUGAAAAGUAJAGCAGUUUCTsT	9%	3%	3%	0%
ND-8549	401	GCCCCGGUAAUGGUGCAGTsT	402	CGUGCACCAUUAACCCGGGCTsT	87%	9%	92%	14%
ND-8550	403	CCCCGGUAAUGGUGCAGTsT	404	CCGUGCACCAUUAACCCGGGTsT	19%	12%	14%	1%
ND-8551	405	CGGGUAAUGGUGCAGCGGTsT	406	GCCCCGUCACCAUUAACCCGTsT	68%	11%	73%	3%
ND-8552	407	GGGUAAUGGUGCAGCGGTsT	408	UGCCCCGUCACCAUUAACCCCTsT	30%	6%	33%	2%
ND-8553	409	UAAUGGUGCAGCGGAGGATsT	410	UCCUGCCCCGUCACCAUUAATsT	29%	3%	31%	1%
ND-8554	411	CUGGUUACUCACGAUGGCCTsT	412	GGCCAUCGUGAGUAACCCAGTsT	74%	15%	66%	8%
ND-8555	413	GUUACUCACGAUGGCCUUCTsT	414	GAGGGCCAUCGUGAGUAACCTsT	91%	21%	88%	10%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8556	415	UGUCACGAUGGUCACCCUCTsT	416	GAGGGUGACCAUCGUGACATsT	72%	4%	76%	12%
ND-8557	417	UGCUCGGAAGGUUCCGAAAGTsT	418	CUUCGGAACCUUCGGAGCATsT	51%	2%	59%	18%
ND-8558	419	UCCGAAAGGUUCCGAAAGCCGTsT	420	CGGCUUCGGAAACCUUCGGATsT	109%	11%	77%	13%
ND-8559	421	UUCGAAAGCCGAUACUGGUTsT	422	ACCAGUAUCGGCUUCGGAATsT	46%	20%	33%	6%
ND-8560	423	AGCCGAUACUGGUCUCCAGTsT	424	CUGGAGACCAGUAUCGGCUTsT	15%	6%	10%	1%
ND-8561	425	CUUGGUACUGCCUCUGAACTsT	426	GUUCAGAGGCAGUAACCAAGTsT	16%	3%	12%	3%
ND-8562	427	CUCCCGUAGCACACUAUAAATsT	428	UUAUJAGUGUCUACGGGAGTsT	14%	6%	10%	1%
ND-8563	429	UCCCGUAGCACACUAUAACTsT	430	GUUAUJAGUGUCUACGGGATsT	43%	11%	36%	4%
ND-8564	431	UGCACCAUACUUUCUUGUATsT	432	UACAAGAAAGUAUGGUGCATsT	17%	6%	13%	3%
ND-8565	433	UUGCCCCUUUAUGUAUGCUTsT	434	AGCAUACAUAAACGGGCAATsT	84%	2%	103%	12%
ND-8566	435	UGCCCCGUUAUGUAUGCUCTsT	436	GAGCAUACAUAAACGGGCATsT	69%	25%	93%	4%
ND-8567	437	GGACCCUAGACCUCUGCAGTsT	438	CUGCAGAGGUCUAGGGUCCTsT	29%	8%	33%	2%
ND-8568	439	CCUAGACCUCUGCAGCCCATsT	440	UGGGCUCGACAGGUCUAGGTsT	18%	2%	19%	1%
ND-8569	441	UGGCAUGAUGUACUGGCAATsT	442	UUGCCAGUACAUCAUGCCATsT	19%	3%	20%	5%
ND-8570	443	UACUGGCAAUUCGGCCUGTsT	444	GCAGGCCGAAUUGCCAGUATsT	86%	15%	83%	16%
ND-8571	445	AUUCGGCCUGCUUUUCCGGTsT	446	CCGAAAAGCAGGCCCGAAUUTsT	19%	3%	24%	4%
ND-8572	447	CUGCUIUUCGGAGAGUAUCUTsT	448	AGUACUCUCCGAAAAGCAGTsT	8%	2%	12%	2%
ND-8573	449	UUCGGAGAGUAUCUUCAGCUTsT	450	AGCUGAAGUACUCUCCGAAATsT	27%	3%	40%	5%
ND-8574	451	AGCAGACGCUCUUCUAGACCUTsT	452	AGGUCAAAAGAGCGUCUGCUTsT	15%	0%	19%	4%
ND-8575	453	CUUGCAGCCCGCUGAGGGUCTsT	454	GACCCUCAGGGCGCUGCAAGTsT	35%	1%	40%	4%
ND-8576	455	UGGCUUUAAACUUGCGGCCUTsT	456	AGGCCGCAAGUAAAAGCCATsT	47%	3%	53%	8%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8577	457	GCUUUAAUUUGCGCCUGGTsT	458	CCAGGCCGCAAGUUAAAAGCTsT	20%	2%	25%	5%
ND-8578	459	UAACUUUGGGCCUGGGUGTsT	460	CACGCCAGGCCGCAAGUUATsT	75%	7%	82%	4%
ND-8579	461	ACUUUJACCCUUCAAAGUATsT	462	UACUUUGAAGGGUAAAAGGUTsT	14%	2%	17%	3%
ND-8580	463	GGUJACUCACGAUGGCCUUTsT	464	AGGGCCAUUCGUGAGUAACCTsT	63%	5%	70%	11%
ND-8581	465	CACGAUGGCCCCUGGUGACTsT	466	GUCACCGAGGGCCAUUCGUGTsT	56%	2%	50%	5%
ND-8582	467	AGAUGCUAUCGCGACAGAATsT	468	UUCUGUCGCGAUAGCAUCUTsT	18%	1%	18%	1%
ND-8583	469	ACGAUGGUCACCCUCCUGUTsT	470	ACAGGAGGGUGACCAUCGUTsT	48%	3%	52%	6%
ND-8584	471	CUCCGAAGUUCCGAAGCCTsT	472	GGUUCGGAACCUUCGGAGTsT	18%	2%	20%	5%
ND-8585	473	AAGUUCCGAAAGCCGAUACTsT	474	GUAUCGGCUUCGGAACCUUTsT	26%	2%	28%	1%
ND-8586	475	GGUACUGCCUCUGAACACUTsT	476	AGUGUUCAGAGGCAGUACCTsT	12%	1%	12%	1%
ND-8587	477	AGCUUUGACAAGGAACUUUTsT	478	AAAGUUCCUUGUCAAAAGCUTsT	17%	2%	18%	2%
ND-8588	479	UUUGACAAGGAACUUUCCUTsT	480	AGGAAAGUUCCUUGUCAAAATsT	78%	5%	73%	2%
ND-8589	481	UGACAAGGAACUUUCCUAATsT	482	UUAGGAAAGUUCCUUGUCATsT	14%	1%	16%	1%
ND-8590	483	CCCGUAGCACACUAUAACATsT	484	UGUUUJAGUGUGCUACGGGTsT	9%	1%	11%	2%
ND-8591	485	CACUAUAACAUCUGCUGGATsT	486	UCCAGCAGAUUUUAUAGUGTsT	18%	2%	20%	2%
ND-8592	487	UUGCUGUUGCACCAUAUCUUTsT	488	AAGUAJGGUGCAACAGCAATsT	23%	2%	25%	8%
ND-8593	489	GUACUGGCAUUUCGGCCUGTsT	490	CAGGCCGAAUUGCCAGUACTsT	66%	3%	62%	4%
ND-8594	491	UUCGGCCUGCUUUUCGGAGTsT	492	CUCCGAAAAGCAGGCCGAATsT	97%	7%	86%	8%
ND-8595	493	CCUGCUUUUCGGAGAGUACTsT	494	GUACUCUCCGAAAAGCAGGTsT	11%	2%	14%	3%
ND-8596	495	GCUUUUCGGAGAGUACUUCTsT	496	GAAGUACUCUCCGAAAAGTsT	12%	1%	17%	2%
ND-8597	497	CUUUUCGGAGAGUACUUCATsT	498	UGAAGUACUCUCCGAAAAGTsT	11%	1%	14%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del primer cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8598	499	CAACCUCAACUCGGACAAGTsT	500	CUUGUCCGAGUUAGGUUGTsT	15%	2%	16%	2%
ND-8599	501	CUACCAGACAUACUCAUCATsT	502	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGTsT	17%	1%	18%	2%
ND-8600	503	CUGUCGAGGCUGCCAGAGATsT	504	UCUCUGGCAGCCUCGACAGTsT	17%	0%	16%	1%
ND-8601	505	AAACUGCUAUACUUCAAUTsT	506	AUUGAAAAGUAUAGCAGUUUTsT	28%	1%	26%	1%
ND-8602	507	GGCUUUAAACUUGCGGCCUGTsT	508	CAGGCCGCAAGUUAAAAGCCTsT	21%	2%	18%	1%
ND-8603	509	CUUUAAACUUGCGGCCUGTsT	510	GCCAGGCCGCAAGUUAAAAGTsT	81%	2%	69%	6%
ND-8604	511	AGGUGUGUAUUCACUCCUGTsT	512	CAGGAGUGAAUACACACCUTsT	47%	4%	40%	1%
ND-8605	513	ACGAUGGCCUCUGGUGACATsT	514	UGUCACCGAGGGCCAUCGUTsT	40%	6%	35%	2%
ND-8606	515	CUGAACACUCUGGUUUUCCCTsT	516	GGAAACCCAGAGUGUUACAGTsT	60%	2%	75%	4%
ND-8607	517	CUAUACAUCUCUGGAGUTsT	518	ACUCCAGCAGAUGUUUAUAGTsT	17%	1%	24%	3%
ND-8608	519	GCACCAUAUUUCUUGUACTsT	520	GUACAAGAAAAGUAUGGUGCTsT	10%	1%	15%	3%
ND-8609	521	UGUCUAGCCCCAUCAUCCUGTsT	522	CAGGAUGAUGGGCUAGACATsT	62%	2%	75%	12%
ND-8610	523	AGGACCCUAGACCUCUCGCATsT	524	UGCAGAGGUCUAGGGUCCUTsT	61%	5%	73%	10%
ND-8611	525	CCACCCGUCUCCUACCCGAGATsT	526	CUCUCGGUAGGAGCGGUGGTsT	21%	2%	29%	5%
ND-8612	527	UACCGAGAGCUCUUCGAGUTsT	528	ACUCGAAGAGCUCUCGGUATsT	13%	1%	22%	3%
ND-8613	529	AACAUCUUGUCGAGGCUGTsT	530	GCAGCCUCGACAGGAUGUUTsT	57%	2%	70%	4%
ND-8614	531	GAACCUUUACCCCUCAAAGTsT	532	CUUUUGAAGGGUAAAAGUUUCTsT	13%	3%	16%	2%
ND-8615	533	GGUUCGGAAGCCGGAUACUGTsT	534	CAGUAUCGGCUUCGGAACCTsT	18%	1%	24%	2%
ND-8616	535	AAGCCGAUACUGGUCUCCATsT	536	UGGAGACCAGUAUCCGGCUUTsT	19%	1%	25%	2%
ND-8617	537	UCUAGCCCCAUCAUCCUGTsT	538	AGCAGGAUGAUGGGCUAGATsT	93%	3%	101%	3%
ND-8618	539	CGGGCCCAUCCGCCUGGUGTsT	540	CACCAGGCCGAUGGCCGCCGTsT	85%	4%	99%	4%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del primer cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8619	541	UUUUCGGAGAGUACUUCAGTsT	542	CUGAAGUACUCUCCGAAAATsT	63%	2%	77%	3%
ND-8620	543	GAGAGUACUUCAGCUACCCTsT	544	GGGUAGCUGAAGUACUCUCTsT	26%	1%	30%	4%
ND-8621	545	GACGCCUUUGACCUGUACTsT	546	GUACAGGUCAAAAGAGCGUCTsT	17%	2%	19%	3%
ND-8622	547	UGUGUUAUCACUCCUGCUUTsT	548	AAGCAGGAGUAAUACACATsT	49%	3%	58%	11%
ND-8623	549	AACAACAAGAGAAAUGGGAGTsT	550	CUCCAUUUCUCUUGUUGUUTsT	74%	7%	70%	4%
ND-8624	551	AUUGAAGGAUGUGCAGGGCTsT	552	GCCUGCACAUCCUCAAUTsT	85%	6%	87%	12%
ND-8625	553	UCUCAGAGCCGCCAAACUTsT	554	AGUUUGGCGCUCUGAGATsT	53%	3%	51%	6%
ND-8626	555	AAACACAACCAAGGUACATsT	556	UGUACCCUUGGUUGUUGUUTsT	17%	2%	18%	2%
ND-8627	557	UACCCGUGCCCUACACAGATsT	558	CUCUGAGGGCACGGGUATsT	58%	3%	55%	3%
ND-8628	559	UAGCACACUAJAAACAUCUGTsT	560	CAGAUGUUUAUGUGUCUATsT	64%	3%	64%	15%
ND-8629	561	GGUGUGUAUUCACUCCUGCTsT	562	GCAGGAGUAAUACACACCTsT	25%	3%	23%	2%
ND-8630	563	CAUGAUCAAAGGAGUGUGGCTsT	564	GCCACACUCCUUGAUCAUGTsT	32%	2%	28%	2%
ND-8631	565	ACUCACGAUGGCCCUCCGGUTsT	566	ACCGAGGCCAUCCGUGAGUTsT	96%	1%	88%	4%
ND-8632	567	GGAGCUUUGACAAGGAACUTsT	568	AGUUCUUGUCAAAAGCUCCTsT	14%	1%	14%	2%
ND-8633	569	AUACCCGUGCCCUACAGATsT	570	UCUGAGGGCACGGGUATsT	21%	2%	16%	1%
ND-8634	571	GGAGUGGCCAAAAGUCAACATsT	572	UGUUGACUUUGGCCACUCCTsT	21%	3%	16%	1%
ND-8635	573	AACUACAAAACCAAUUCUGTsT	574	CAGAAUJGGUUUUUGUUGUUTsT	49%	5%	37%	3%
ND-8636	575	UGCUGGAGUGUUGCUGUUGTsT	576	CAACAGCAACACUCCAGCATsT	27%	3%	21%	2%
ND-8637	577	AGGUCUCCUGCAACCAGGCTsT	578	GCCUGGUUGCAGGAGACCUTsT	62%	8%	61%	4%
ND-8638	579	CUUUGGAUGAUGUACUGGTsT	580	CCAGUACAUCUAGCCAAAAGTsT	66%	6%	52%	8%
ND-8639	581	CAUCUGCACCCCUCAAUCCCTsT	582	GGGAUUGAGGGUGGCAGAUUGTsT	50%	7%	40%	4%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8640	583	CGACUGCACCAAGAAUGGCTsT	584	GCCAUUCUUGGUGCAGUCGTsT	67%	6%	54%	5%
ND-8641	585	AAACACAACCAAGGGUACTsT	586	GUACCCUUGGUUGUUUUUUsT	14%	2%	14%	1%
ND-8642	587	CAUCUGCUGGAGUGUUGCUTsT	588	AGCAACACUCCAGCAGAUGTsT	13%	2%	13%	1%
ND-8643	589	CCUACAUCUUCUAUCCGGTsT	590	CGCGGAUAGAAGAUGUAGGTsT	15%	4%	13%	0%
ND-8644	591	GCCUACAUCUUCUAUCCGGTsT	592	GCGGAUAGAAGAUGUAGGTsT	14%	3%	11%	1%
ND-8645	593	GAGUGGUACCGCUUCCACUTsT	594	AGUGGAAGCGGUACCACUCtsT	16%	0%	20%	1%
ND-8646	595	GGUACCGCUUCCACUAUAUsT	596	AUGUAGUGGAAGCGGUACCts	12%	0%	14%	1%
ND-8647	597	GUGGUACCGCUUCCACUAUsT	598	GUAGUGGAAGCGGUACCACtsT	42%	4%	44%	3%
ND-8648	599	GAAUACUCUCACUUCACCTsT	600	GUGGAAGUGAGAGUAAUUsT	10%	1%	11%	3%
ND-8649	601	AAUACUCUCACUUCACCTsT	602	GGUGGAAGUGAGAGUAAUUsT	105%	10%	102%	8%
ND-8650	603	UACUCUCACUUCACACCTsT	604	GGUGGUGGAAGUGAGAGUAUsT	55%	6%	54%	8%
ND-8651	605	AGUGGUACCGCUUCCACUAUsT	606	UAGUGGAAGCGGUACCACUsT	57%	6%	59%	12%
ND-8652	607	GGGCAACUUCUAUCUUCGCCTsT	608	GGCGAAGAUGAAGUUGCCCTsT	47%	12%	36%	7%

Tabla1B: ARNi corto seleccionados en el conjunto de cribado extendido (ARNi corto "humanos solamente"). Se identificaron 344 secuencias de ARNi adicionales y se diseñaron para ser completamente complementarios para las secuencias de alfa-ENaC humanas, de acuerdo con los criterios de diseño descritos en la sección de ejemplos. Todos los ARNi corto enlistados en este conjunto de cribado se modificaron solamente con un enlace de fosforitoato en el extremo 3' entre los nucleótidos 20 y 21 de cada cadena. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en el ensayo de transfección de una sola dosis (remítase a la sección de ejemplos para ver los métodos empleados).

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10445	609	CUGCGGCUAAGUCUCUUUUUtsT	610	AAAAGAGACUUAGCCCGCAGTsT	94%	8%
ND-10446	611	AUCGCGACAGAACAAUUUACTsT	612	GUAUUUUUCUGUCGCGAUsT	13%	2%
ND-10447	613	UCGCGACAGAACAAUUUACATsT	614	UGUAUUUUUCUGUCGCGGATsT	18%	1%
ND-10448	615	CCCGUUUAUGUAUGCUCCATsT	616	UGGAGCAUACAUAAACGGGTsT	41%	1%
ND-10449	617	CCCGGUAAAGUAAAAGGCAGTsT	618	CUGCCUUUACUUACCCGGGTsT	23%	1%
ND-10450	619	GGUACCCGAAAUUAAAAGATsT	620	UCUUUAAUUUCCGGGUACCTsT	14%	2%
ND-10451	621	GCUAUCGCGACAGAACAAUsT	622	AUUGUUUCUGUCGCGAUAGCTsT	24%	2%
ND-10452	623	UAUCGCGACAGAACAAUUUATsT	624	UAAUUUUUCUGUCGCGGAUATsT	12%	1%
ND-10453	625	UGCGGCUAAGUCUCUUUUUtsT	626	AAAAGAGACUUAGCCCGCAGTsT	46%	3%
ND-10454	627	GCGGAUUUUGGCGACUGCATsT	628	UGCAGUCGCCAUAAUCCGCTsT	14%	0%
ND-10455	629	AUGUCJAGCCCAUCAUCCUsT	630	AGGAUGAUGGGCUAGACAUUsT	12%	2%

(continuación)

ID de Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10456	631	CUACAGGUACCCGGAAAUUtsT	632	AAUUCCGGGUACCUGUAGTsT	28%	2%
ND-10457	633	CCGUCGAGCCCCGUAGGUGTsT	634	CACGCUACGGGCUCGACGGTsT	27%	3%
ND-10458	635	CGCGACAGAACAUAUACACTsT	636	GUGUAAUUGUUUCUGUCGCGTsT	39%	7%
ND-10459	637	AGGUACCCGGAAAUAAGTsT	638	CUUUAAUUUCCGGGUACCUTsT	30%	3%
ND-10460	639	CAUGCACGGGUUCCUGCCTsT	640	GGCAGGAAACCCGUGCAUGTsT	95%	6%
ND-10461	641	AGCUUGCGGGACAACAACCTsT	642	GGUUGUUGUCCCGCAAGCUTsT	94%	8%
ND-10462	643	ACUGCGGCUAAGUCUCUUUTsT	644	AAAGAGACUJAGCCGCAGUTsT	13%	2%
ND-10463	645	CAUCCUUJAGAACCUCUGCUTsT	646	AGCAGGGUUCUJAAAGGGAUGTsT	18%	1%
ND-10464	647	ACCCGGUJAAAGUAAAAGGCATsT	648	UGCCUUUACUUACCCCGGGUTsT	41%	1%
ND-10465	649	GAUUUJGGCGACUGCACCATsT	650	UGGUGCAGUCGCCAUAAUUCTsT	23%	1%
ND-10466	651	CUCGGACAAGCUCGUUCUUCTsT	652	GAAGACGAGCUUGUCCCGAGTsT	14%	2%
ND-10467	653	GCGAUUAUGGCGACUGCACTsT	654	GUGCAGUCGCCAUAAUCCGCTsT	24%	2%

(continuación)

ID de Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10468	655	AAUUAACCCGUCAAACAATsT	656	UGUUGUUGACGGUGUAAUUsT	12%	1%
ND-10469	657	AACUGCCGUUGAUGUGGGTsT	658	CCACACAUCAACGGCAGUUsT	46%	3%
ND-10470	659	AACUGCGGCUAAGUCUCUUsT	660	AAGAGACUUAGCCGCAGUUsT	14%	0%
ND-10471	661	CCGCUGAUAAACCAGGACAATsT	662	UUGUCCUGGUUAUCAGCGGTsT	12%	2%
ND-10472	663	AAGGGUACACGCAGGCAUGTsT	664	CAUGCCUGCGUGUACCCUUsT	28%	2%
ND-10473	665	CCGGUAAGUAAAGGCAGATsT	666	UCUGCCUUUACUUACCCGGTsT	27%	3%
ND-10474	667	CCCAUACCAGGUCUCAUGGTsT	668	CCAUGAGACCUGGUUAGGGTsT	39%	7%
ND-10475	669	AUUUAGGGGACUCGACCCAATsT	670	UUGGUCAGUCGCCAUAAUUsT	30%	3%
ND-10476	671	AUGCACGGGUUUCUGCCCTsT	672	GGGCAGGAAACCCGUGCAUUsT	95%	6%
ND-10477	673	CUAGCCCUCCACAGUCCACTsT	674	GUGGACUGUGGAGGGCUAGTsT	43%	7%
ND-10478	675	CAGGUACCCGGAAUUAAAATsT	676	UUUAAUUUCCGGGUACCCUGTsT	11%	1%
ND-10479	677	AAUACAGCUCCUUCACCACTsT	678	GUGGUGAAGGAGCUGUAUUsT	30%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10480	679	CACGGUUUCCUGCCCAGCTsT	680	GCUGGCAGGAAACCCGUGTsT	19%	1%
ND-10481	681	GGACUGAAUCUUGCCCCGUUTsT	682	AACGGGCAAGAUUCAGUCCTsT	14%	2%
ND-10482	683	CGUUUAUGUAGCUCCAUGTsT	684	CAUGGAGCAUACAUAACGTsT	15%	1%
ND-10483	685	GGGUACUGCUACUAUAAGCTsT	686	GCUUUAUGUAGCAGUACCCTsT	11%	0%
ND-10484	687	UCGGUGUUGUCUGUGGUGTsT	688	CCACCACAGACAACACCGATsT	65%	5%
ND-10485	689	AAACUGCCGUUGAUGUGUGTsT	690	CACACAUCAACGGCAGUUUTsT	73%	6%
ND-10486	691	GCGAAACUUGGAGCUUUGATsT	692	UCAAGCUCCAAGUUUCGCTsT	8%	1%
ND-10487	693	GGCCCCGUCGAGCCCCGUAGCTsT	694	GCUACGGGCUUCGACGGGCCCTsT	26%	3%
ND-10488	695	GCGACAGAACAUAUACACCTsT	696	GGUGUAAUUUUCUCUGCGCTsT	10%	2%
ND-10489	697	GCGACGGCUUAAGCCAGCCTsT	698	GGCUGGCUUAAGCCGUGCGTsT	50%	1%
ND-10490	699	GACCCGGUUAAGUAAAGGCTsT	700	GCCUUUACUUACCCGGGUCTsT	74%	1%
ND-10491	701	UUGAUCAGUCCGCCUUUCUCTsT	702	GAGAAGCGGAGUGAUCAATsT	80%	7%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del primer cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10492	703	UCUAGCCCCUCCACAGUCCATsT	704	UGGACUGGGAGGCCUAGATsT	69%	4%
ND-10493	705	GUUUCACCAAGUGCCGGAAATsT	706	UUCGGCACUJGGUGAAAACtsT	23%	3%
ND-10494	707	CUCAACUCGGACAAGCUCGtsT	708	CGAGCUUUCGGAGUUUGAGTsT	45%	6%
ND-10495	709	CAACUCGGACAAGCUCGUCTsT	710	GACGAGCUJGUCCGAGUUUGTsT	23%	3%
ND-10496	711	ACCCGGAAAUJAAAGAGGATsT	712	UCCUCUUJAAUUUCCGGGUTsT	13%	2%
ND-10497	713	CCCGAAAUJAAAGAGGAGTsT	714	CUCCUCUUJAAUUUCCGGGTsT	19%	1%
ND-10498	715	CACCACUCUCUGGCCCGCTsT	716	GCCGGCCACGAGAGUGGUGTsT	94%	11%
ND-10499	717	CGUCGAGCCCGUAGCGUGGTsT	718	CCACGCUACGGGCUAGCGTsT	13%	1%
ND-10500	719	GCUUGCGGGACAACAACCCCTsT	720	GGGUUJUGUCCCGCAAGTsT	49%	2%
ND-10501	721	GAAUCAACAACGGUCUCUGUCTsT	722	GACAGACCGUJUGUJGAUUUCTsT	18%	2%
ND-10502	723	GGCGAUUJUGGCCGACUGCTsT	724	GCAGUCGCCAUJAAUCCGCCCTsT	8%	1%
ND-10503	725	CGAUUJUGGCCGACUGCACCTsT	726	GGUGCAGUCGCCAUJAAUCCGTsT	17%	1%

(continuación)

ID del Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10504	727	UCUGCUGGUUACUCACGAUTsT	728	AUCGUGAGUAACCAGCAGATsT	38%	4%
ND-10505	729	CUAUCGGGACAGAACAAUUTsT	730	AAUUGUUUCUGUCGGGAUAGTsT	9%	1%
ND-10506	731	CAAUUACACCGUCAACAAsTsT	732	GUUGUUAGCGGUGUAAUUGTsT	11%	1%
ND-10507	733	ACCGUCAACAACAAGAGAAATsT	734	UUCUCUUUGUUUGACGGUTsT	9%	1%
ND-10508	735	CUCCUCGGUUGUCUGUGTsT	736	CACAGACAACACCGAGGAGTsT	78%	5%
ND-10509	737	GGAGUAGCCUCCACCCUGTsT	738	CAGGGUGGAGGCUACCUCCTsT	18%	1%
ND-10510	739	GGAGAGUUUCACACCATsT	740	UGGUGUGAGAAACCUCCCTsT	13%	1%
ND-10511	741	CUGCCGUUGAUGUGGGAGTsT	742	CUCCACACAUAACGGCAGTsT	19%	2%
ND-10512	743	UGCCGUUGAUGUGGGAGTsT	744	CCUCCACACAUAACGGCATsT	82%	4%
ND-10513	745	AGAUGGGUAAGGGCUCAGGTsT	746	CCUGAGCCCCUUAACCAUCUTsT	24%	1%
ND-10514	747	AGAACAGUAGCUGAUGAAGTsT	748	CUUCAUCAGCUCUGUUCUTsT	15%	0%
ND-10515	749	GCGGCUAAGUCUCUUUUUCTsT	750	GAAAAAGAGACUUAGCCGCTsT	13%	1%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10516	751	CCUAAGAAACCGCUGAUAA TsT	752	UUUAUCAGCGUUUCUUAAGGTsT	6%	0%
ND-10517	753	GAAACCGCUGAUAAACCAGGTsT	754	CCUGGUUAUCAGCGGUUUUCTsT	13%	0%
ND-10518	755	AACCGCUGAUAAACCAGGACTsT	756	GUCCUGGUUAUCAGCGGUUUTsT	42%	2%
ND-10519	757	ACCGCUGAUAAACCAGGACATsT	758	UGUCCUGGUUAUCAGCGGUTsT	11%	1%
ND-10520	759	CCAAGGGUACACGCAGGCATsT	760	UGCCUGCGUGUACCCUUGGTsT	19%	1%
ND-10521	761	CAAGGGUACACGCAGGCAUTsT	762	AUGCCUGCGUGUACCCUUGTsT	12%	0%
ND-10522	763	AGGGUACACGCAGGCAUGCTsT	764	GCAUGCCUGCGUGUACCCUTsT	23%	1%
ND-10523	765	GUACACGCAGGCAUGCACGTsT	766	CGUGCAUGCCUGCGUGUACTsT	27%	1%
ND-10524	767	AGGCAUGCACGGGUUUCCUTsT	768	AGGAAACCCGUGCAUGCCUTsT	14%	0%
ND-10525	769	GGCAUGCACGGGUUUCCUGTsT	770	CAGGAAACCCGUGCAUGCCTsT	18%	3%
ND-10526	771	ACGGGUUUCCUGCCAGCGTsT	772	CGCUGGGCAGGAAACCCGUTsT	30%	1%
ND-10527	773	GAGCAGACCCGGUAAGUATsT	774	UACUUACCCGGUCUGCUCTsT	24%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10528	775	AGCAGACCCGGGUAAGUAATsT	776	UUACUUACCCGGGUCUGCUTsT	24%	2%
ND-10529	777	GGGUAAGUAAAGGCAGACCTsT	778	GGUCUGCCUUUACUUACCCTsT	39%	3%
ND-10530	779	AGCCUCAUACCCGGUGCCCTsT	780	AGGGCACGGGUJAUJAGGGCUTsT	82%	5%
ND-10531	781	GUGAACGCUUCUGCCACAUTsT	782	AUGJGGCAGAAGCGUJUAUCTsT	13%	1%
ND-10532	783	AAAUUGAUCACUCCGCCUUTsT	784	AAGGGGAGUGAUCAAUUUTsT	18%	2%
ND-10533	785	AAUUGAUCACUCCGCCUUCTsT	786	GAAGGGGAGUGAUCAAUUUTsT	19%	0%
ND-10534	787	GCCUJGCGGUCAGGGACUGTsT	788	CAGUCCCUJGACCCGCAAGGCTsT	12%	1%
ND-10535	789	CUUGCGGUCAGGGACUGAAATsT	790	UUCAGUCCCUJGACCCGCAAGTsT	11%	0%
ND-10536	791	UUGCGGUCAGGGACUGAAUTsT	792	AUUCAGUCCCUJGACCCGCAATsT	12%	0%
ND-10537	793	AUGUAUGCUCCAUGUCUAGTsT	794	CUAGACAUGGAGCAUAUCAUTsT	21%	1%
ND-10538	795	AGCAAGUAGGCAGGAGCUCTsT	796	GAGCUCCUGCCUACUJGUCUTsT	19%	1%
ND-10539	797	CAGCCCAUACCAGGUCUCATsT	798	UGAGACCUJGUAUGGGCUGTsT	27%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10540	799	CAGCCGUCGGACCUCGGTsT	800	CCGCAGGUCGCGACGGCUGTsT	44%	4%
ND-10541	801	GGCCCCGUCGAGCCCCGUAGTsT	802	CUACGGGCUJCGACGGGGCCCTsT	71%	6%
ND-10542	803	CGUAGCGUGGGCCUCCAGCUTsT	804	AGCUGGAGGGCCACGCCUACGTsT	84%	9%
ND-10543	805	GGUGAGGGAGUGGUACCCGCTsT	806	GCGGUACCACUCCUCACCTsT	108%	8%
ND-10544	807	AAAGUACACACAGCAGGUGTsT	808	CACCUJGUCUGUGUACUUUTsT	140%	7%
ND-10545	809	CCAGGUUGACUUUCUCATsT	810	UGAGGAGAAGUCAACCUJGGTsT	18%	2%
ND-10546	811	UGUUUACCAAGUGCCGGATsT	812	UCCGGCACUUJGUGAAACATsT	31%	2%
ND-10547	813	UGCUGGUUACUCACGAUGGTsT	814	CCAUCGUGAGUAACCAGCATsT	144%	10%
ND-10548	815	UCCUCGGUGUUGUCUGUGGTsT	816	CCACAGACAACACCGAGGATsT	106%	14%
ND-10549	817	AGGUAGCCUCCACCCUJGGCTsT	818	GCCAGGGUGGAGGCUACCUtTsT	74%	15%
ND-10550	819	GCCGUUGAUGUGUGGAGGGTsT	820	CCCUCACACAUCAACGGCTsT	26%	4%
ND-10551	821	GAUGGUAAAGGGCUCAGGATsT	822	UCCUGAGCCCCUJACCCAUCTsT	22%	1%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND- 10552	823	CCCAACUGCGGCUAAGUCUTsT	824	AGACUJAGCCGCAGUUGGGTsT	18%	2%
ND- 10553	825	CCAAGCGAAACUUGGAGCUTsT	826	AGCUCCAAGUUUCGCUUGGGTsT	16%	1%
ND- 10554	827	GGGUACACGCGAGGCAUGCATsT	828	UGCAUGCCUGCGUGUACCCCTsT	19%	2%
ND- 10555	829	UGCACGGGUUUCCUGCCCCATsT	830	UGGGCAGGAAACCCGUGCATsT	28%	2%
ND- 10556	831	CUCCUCUAGCCUCAUACCCTsT	832	GGGU AUGAGGCUJAGAGGAGTsT	109%	8%
ND- 10557	833	UCCUCUAGCCUCAUACCCGCTsT	834	CGGGU AUGAGGCUJAGAGGATsT	117%	7%
ND- 10558	835	UCUAGCCUCAUACCCGUGCTsT	836	GCACGGU AUGAGGCUJAGATsT	128%	9%
ND- 10559	837	UUCAUACCUCUACAUGUCUTsT	838	AGACAUJAGAGGUJUGAATsT	52%	4%
ND- 10560	839	UCUACAUGUCUGCUUGAGATsT	840	UCUCAAGCAGACAUJUGATsT	15%	2%
ND- 10561	841	AUAUUUCCUCAGCCUGAAATsT	842	UUUCAGGCUJAGGAAAUATsT	15%	2%
ND- 10562	843	AACUCCUAUGCAUCCCUJATsT	844	UAAGGGAUGCAUJAGGAGUUTsT	14%	1%
ND- 10563	845	GCAUCCCUUAGAACCUCUGCTsT	846	GCAGGGUUUCUAAGGGAUGCTsT	20%	1%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10564	847	UGAUCACUCCGCCUUUCUCCTsT	848	GGAGAAAGCGGAGUGAUCATsT	67%	7%
ND-10565	849	UGUAAGUGCCUUUGCGGUCATsT	850	UGACCGCAAGGCACUUACATsT	17%	2%
ND-10566	851	CCUUGCGGUCAGGGACUGATsT	852	UCAGUCCCCUGACCCGCAAGGTsT	14%	1%
ND-10567	853	AAUCUUJGCCCCGUUUUAUGUATsT	854	UACAUAAAACGGGCAAGAUAUTsT	13%	2%
ND-10568	855	CCGUUUUAUGUAUGCUCCAUTsT	856	AUGGAGCAUACAUAAAACGGTsT	19%	6%
ND-10569	857	UGUAUGCUCCAUGUCUAGCTsT	858	GCUAGACAUGGAGCAUACATsT	87%	13%
ND-10570	859	CAUGUCUAGCCCAUCAUCCTsT	860	GGAUGAUGGGCUAGACAUGTsT	33%	4%
ND-10571	861	AGUAGGCAGGAGCUCAAUATsT	862	UAUUAGCUCUCCUGCCUACUTsT	11%	1%
ND-10572	863	CCUACAGGUACCCGGAAAUTsT	864	AUUUCCGGGUACCUGUAGGTsT	22%	3%
ND-10573	865	CCCGUCGAGCCCGUAGCGUTsT	866	ACGCUACGGGCUAGCAGGGTtsT	23%	1%
ND-10574	867	GCGGUGAGGGAGUGGUACCTsT	868	GGUACACUCCUCCACCCGCTsT	30%	1%
ND-10575	869	UUUAGGCGACUGCACCAAGTsT	870	CUUUGGUCAGUCGCGCAUAATsT	77%	6%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10576	871	CUAUAAGCUCCAGGUUGACTsT	872	GUCAACCUGGAGCUUAUAGTsT	11%	1%
ND-10577	873	UAUAAGCUCCAGGUUGACUTsT	874	AGUCAACCUGGAGCUUAUAUAUsT	42%	8%
ND-10578	875	AGGUUGACUUCUCCUCAGATsT	876	UCUGAGGAGAAGUCAACCUTsT	13%	3%
ND-10579	877	CUGGGCUGUUUCACCAAGUTsT	878	ACUUGGUGAAACAGCCCAGTsT	19%	6%
ND-10580	879	AACAAUUACACCGUCAACATsT	880	UGUUAGCGGUGUAAUUUGUUTsT	13%	1%
ND-10581	881	UGGGUAAGGCUCAGGAAGTsT	882	CUUCCUGAGCCCUUACCCATsT	20%	3%
ND-10582	883	GGGUAAGGCUCAGGAAGUTsT	884	ACUCCUGAGCCCUUACCCCTsT	22%	3%
ND-10583	885	CACCCAACUGCGGCUAAGUTsT	886	ACUUAGCCGCAGUUGGGUGTsT	22%	10%
ND-10584	887	ACCCAACUGCGGCUAAGUCTsT	888	GACUUAGCCGCAGUUGGGUGTsT	22%	5%
ND-10585	889	CCAAACUGCGGCUAAGUCUCTsT	890	GAGACUUAGCCGCAGUUGGGTsT	14%	2%
ND-10586	891	CUUGGAUCAGCCAAGCGAATsT	892	UUCGCUUGGCUGAUCCAAGTsT	15%	1%
ND-10587	893	GCCAAAGCGAAACUUGGAGCTsT	894	GCUCCAAGUUUCGCUUGGCTsT	17%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10588	895	UCCUAAAGAAACCGCUGAUATsT	896	UAUCAGCGGUUUCUUAGGATsT	11%	2%
ND-10589	897	GCAUGCACGGGUUUUCCUGCTsT	898	GCAGGAAACCCCGUGCAUGCTsT	24%	8%
ND-10590	899	UGUUACUUAAGGCAAUUCCCTsT	900	GGGAAUUGCCUAAGUAACATsT	48%	10%
ND-10591	901	CUAGGGCUAGAGCAGACCCTsT	902	GGGUCUGCUCUAGCCCUAGTtT	58%	10%
ND-10592	903	CUCUAGCCUCAUACCCGUGTtT	904	CACGGGUUAGAGGCUAGAGTtT	34%	5%
ND-10593	905	UUAGAACCUCUCUCAGACATsT	906	UGUCUGAGCAGGGUUCUAAATsT	14%	1%
ND-10594	907	UGUGAACGCUUCUGCCACATsT	908	UGUGGCAGAAGCGUUCACATsT	15%	0%
ND-10595	909	AUUGAUCACUCCGCCUUCUTsT	910	AGAAGCGGGAGUGAUCAAUTsT	43%	1%
ND-10596	911	UCACUCCGCCUUCUCCUGGTtT	912	CCAGGAGAAGGGGAGUGATtT	90%	5%
ND-10597	913	GCGGUCAGGGACUGAAUCUTsT	914	AGAUUCAGUCCCUGACCCGTtT	11%	0%
ND-10598	915	GGUCAGGGACUGAAUCUUGTtT	916	CAAGAUUCAGUCCCUGACCTtT	13%	1%
ND-10599	917	GUAUGCUCUCCUAGCCTsT	918	GGCUAGACAUGGAGCAUACTsT	28%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10600	919	CCAUGUCUAGCCCAUCAUCTsT	920	GAUGAUGGGCUAGACAUGGTsT	12%	1%
ND-10601	921	GAUCGAGUUCCACCGCUCCTsT	922	GGAGCGGUGGAACUCGAUCTsT	17%	1%
ND-10602	923	GGACUCUAGCCCUCCACAGTsT	924	CUGUGGAGGGCUAGAGUCCTsT	41%	4%
ND-10603	925	UCACCACUCUCGUGGCCCGTsT	926	CCGCCACGAGAGUGGUGATsT	83%	3%
ND-10604	927	CAGCUUGCGGGACAACAAsT	928	GUUGUUGUCCCCGCAAGCUGTsT	21%	1%
ND-10605	929	CAUCUUCUAUCCGCGCCCTsT	930	GGGCCGCGGAUAGAAGAUGTsT	26%	2%
ND-10606	931	AUAAGCUCCAGGUUGACUUTsT	932	AAGUCAACCUGGAGCUUAUTsT	15%	1%
ND-10607	933	CUGCUGGUUACUCACGAUGTsT	934	CAUCGUGAGUAACCAGCAGTsT	85%	8%
ND-10608	935	GAACAAUUACACCGUCAACTsT	936	GUUGACGGUGUAUUUGUUCTsT	13%	1%
ND-10609	937	AUUACACCGUCAACAACAAsT	938	UUUGUUGUACGGUGUAAUTsT	12%	0%
ND-10610	939	CUGUGGUJCGGCUCUCGGTsT	940	CCGAGGAGCCGAACCACAGTsT	53%	2%
ND-10611	941	GAAUGCCUUGGCUCACAGTsT	942	GCUGGAGCCAAGGCACUUCTsT	24%	3%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10612	943	GAUCAGCCAAAGCGAAACUUTsT	944	AAGUUUCGUUGGCUGAUCTsT	12%	0%
ND-10613	945	AGAAACCGCUGAUAAACCAGTsT	946	CUGGUUAUCAGCGGUUUCUTsT	12%	1%
ND-10614	947	UGAUAAACCAGGACAAAAACATsT	948	UGUUUUGUCCUGGUUAUCATsT	7%	1%
ND-10615	949	CAGCAGGCAUGCACGGGUTsT	950	ACCCGUGCAUGCCUGCGUGTsT	12%	0%
ND-10616	951	GCUCUCCAGUAGCACAGAUTsT	952	AUCUGUGCUACUGGAGAGCTsT	9%	1%
ND-10617	953	CAGACCCGGUAAGUAAAAGTsT	954	CUUUACUUACCCGGGUCUGTsT	55%	3%
ND-10618	955	AGACCCGGUAAGUAAAAGTsT	956	CCUUUACUUACCCGGGUCUTsT	72%	8%
ND-10619	957	AUCACUCCGCCUUCUCCUGTsT	958	CAGGAGAAGCGGGAGUGAUTsT	63%	6%
ND-10620	959	CACUCCGCCUUCUCCUGGGTsT	960	CCCAGGAGAAGCGGGAGUGTsT	28%	1%
ND-10621	961	AACUAGACUGUAAGUGCCUTsT	962	AGGCACUUACAGUCUAGUUTsT	23%	1%
ND-10622	963	UAUGCUCUAGUCUAGCCCTsT	964	GGGCUAGACAUAGGAGCAUATsT	98%	2%
ND-10623	965	CCCGAUGUAUGGAAACUGCTsT	966	GCAGUUUCCAUACAUCGGGTsT	11%	1%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10624	967	GUACUGCUACUUAAGCUCtTsT	968	GAGCUUAJAGUAGCAGUACTsT	19%	1%
ND-10625	969	AGCGUGACCAGCUACCAGCTsT	970	GCUGGUAGCUGGUCACGCUTsT	49%	2%
ND-10626	971	ACAAUUACACCCGUCACAAATsT	972	UUGUUAGCCGGUGUAAUUGUTsT	8%	0%
ND-10627	973	AUGCUCUCUGGGGAGGTsT	974	CCUCCCACCAGAGGCAUTsT	76%	5%
ND-10628	975	AACAGUAGCUGAUGAAGCUTsT	976	AGCUUCAUCAGCUACUGUUTsT	22%	1%
ND-10629	977	CUGACUCCCGAGGGCUAGGTsT	978	CCUAGCCUCGGAGUCAGTsT	34%	2%
ND-10630	979	GUGCAACCAGAACAAAUCGTsT	980	CGAUUUGUUCUGGUUGCACTsT	10%	1%
ND-10631	981	UGCAAACCAGAACAAAUCGGTsT	982	CCGAUUUGUUCUGGUUGCATsT	48%	4%
ND-10632	983	CUUCAAAAGUACACACAGCATsT	984	UGCUGUGUGUACUUUGAAGTsT	20%	1%
ND-10633	985	CAGCGUGACCAGCUACCAGTtTsT	986	CUGGUAGCUGGUCACGCUGTtTsT	35%	1%
ND-10634	987	AGAACAAUUAACACCCGUCAAATsT	988	UUGACGGUGUAAUUGUUCUTsT	14%	0%
ND-10635	989	GAUAAACCAGGACAAAACACTsT	990	GUGUUUUGUCCUGGUUAUCTsT	11%	1%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10636	991	ACAACCAAGGGUACACGCATsT	992	UGCGUGUACCCUUGGUUGUTsT	17%	1%
ND-10637	993	CCCAGCGACGGCUUAAGCCTsT	994	GGCUUAAGCCGUCGCUGGGTsT	27%	2%
ND-10638	995	CUCCCCGAGGGCUAGGGCUATsT	996	UAGCCCCUAGCCCCUCGGGAGTsT	23%	1%
ND-10639	997	UAGAACCUCUGCCUCAGACACTsT	998	GUGUCUGAGCAGGGUUCUATsT	35%	2%
ND-10640	999	CCUGGGCUGUUUCACCAAGTsT	1000	CUUGGUGAAACAGCCCAGGTsT	14%	1%
ND-10641	1001	GGAUCAGCCAAGCGAAACUTsT	1002	AGUUUCGCUUGGCUGAUCCTsT	16%	3%
ND-10642	1003	AAGAAACCUCUGAUAAACCATsT	1004	UGGUUAUCAGCGGUUCUUTsT	17%	1%
ND-10643	1005	ACCAAGGGUACAGCGCAGGCTsT	1006	GCCUGCGUGUACCCUUGGUTsT	37%	4%
ND-10644	1007	GUAGCACAGAUGUCUGCUCTsT	1008	GAGCAGACAUCUGUGCUACTsT	13%	3%
ND-10645	1009	UUUCAUACCUCUACAUGUCTsT	1010	GACAUGUAGAGGUUGAAATsT	88%	8%
ND-10646	1011	CCAACCAUCGCCAGAGAATsT	1012	UUCUCUGGCAGAUUGGUUGTsT	16%	2%
ND-10647	1013	GUCAGGGACUGAAUCUUGCTsT	1014	GCAAGAUUCAGUCCCUGACTsT	16%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10648	1015	AGCAUGAUC AAGGAGUGTsT	1016	CACACUCCUUGAUC AUGCUTsT	50%	7%
ND-10649	1017	GCAGCGUGACCAGCUACCATsT	1018	UGGUAGCUGGUCACGCUGCTsT	40%	6%
ND-10650	1019	CAGCUCUCUGCUGGUUACUTsT	1020	AGUAACCAGCAGAGAGCUGTsT	56%	5%
ND-10651	1021	GUUCGGCUCUCGGUGUGTsT	1022	CAACACCGAGGAGCCGAACTsT	68%	5%
ND-10652	1023	GCAGAUGCUCUCUGGUGTsT	1024	CCACCAGAGGAGCAUCUGCTsT	26%	5%
ND-10653	1025	AGGAAGUUGCUCCAAGAACTsT	1026	GUUCUUGGAGCAACUUCCTsT	18%	2%
ND-10654	1027	AACGCUUCUGCCACAUCUUTsT	1028	AAGAUGUGGCAGAAAGCGUUTsT	18%	1%
ND-10655	1029	CACCUGGGCUUUUACCCATsT	1030	UGGUGAAACAGCCCAGGUGTsT	17%	2%
ND-10656	1031	AAGCCAUGCAGCGUGACCATsT	1032	UGGUCACGCUGCAUGGCUUTsT	27%	3%
ND-10657	1033	CGAGGGCUAGGGCUAGAGCTsT	1034	GCUCUAGCCCCUAGCCCCUCGTsT	30%	1%
ND-10658	1035	GGAAACCCUGGACAGACUUTsT	1036	AAGUCUGUCCAGGGUUUCCTsT	14%	1%
ND-10659	1037	GUAGCUGAUGAAGCUGCCCTsT	1038	GGGCAGCUUCAUCAGCUACTsT	19%	1%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	Dosis única del 2do cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10669	1057	CCAAGAACAGUAGCUGAUGTsT	1058	CAUCAGCUACUGUUUCUUGGTsT	23%	4%	16%	2%
ND-10670	1059	AGGAGAGUUUUCACACCTsT	1060	GGUGUGAGAAAACCUCCUCCTsT	18%	3%	17%	1%
ND-10671	1061	AUCAUCCUGCUUGGAGCAATsT	1062	UUGCUCCAAAGCAGGAUGAUsT	33%	3%	24%	2%
ND-10672	1063	GCAUCACAGAGCAGCGCUTsT	1064	AGCGUCGUCUGUGAUGCTsT	29%	2%	27%	4%
ND-10673	1065	AGGAGGUAGCCUCCACCCUUsT	1066	AGGGUGAGGCUACCUCCUUsT	63%	6%	61%	3%
ND-10674	1067	ACAACCGCAUGAAAGACGGCTsT	1068	GCCGUCUUC AUGCGGUUGUsT	94%	2%		
ND-10675	1069	GCAUGAAGACGGCCUUCUGTsT	1070	CAGAAGCCCGUCUUC AUGCTsT	20%	2%	18%	1%
ND-10676	1071	GUCACGAUGGUCACCCUCCTsT	1072	GGAGGGUGACCAUCGUGACTsT	66%	5%	60%	4%
ND-10677	1073	CCCUGCUCAGACACCAUUAUsT	1074	UAAUGGUGUCUGAGCAGGGTsT	15%	3%	18%	1%
ND-10678	1075	UCACGAUGGUCACCCUCCUUsT	1076	AGGAGGGUGACCAUCGUGATsT	80%	6%	70%	4%
ND-10679	1077	UCAACCUCAACUCGGACAATsT	1078	UUGUCCGAGUUGAGGUUGATsT	20%	3%	21%	1%
ND-10680	1079	UGACCAGCUAC CAGCUCUCTsT	1080	GAGAGCUGGUGAGCUGGUCATsT	88%	22%	77%	5%
ND-10681	1081	GAUGGCCUCCGUGACAUCUsT	1082	GAUGCACCGAGGGCCAUCUsT	88%	18%	60%	4%

(continuación)

ID del Duplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	Dosis única del 2do cribado @ 50 nM en	SD
ND-10682	1083	GCUUUGACAAGGAACUUUUCTsT	1084	GAAAGUCCUUGUCAAAAGCTsT	19%	7%	14%	2%
ND-10683	1085	CGAUACUGGGUCUCCAGGCCTsT	1086	GGCCUGGAGACCAGUAUCGTsT	27%	5%	27%	2%
ND-10684	1087	UCUGGAUGUCUUCCAUGCCTsT	1088	GGCAUGGAAAGACAUCAGATsT	92%	13%	89%	3%
ND-10685	1089	CAGGACCCUAGACCUCUGCTsT	1090	GCAGAGGUCUAGGGUCCUGTsT	58%	14%	50%	2%
ND-10686	1091	GACCCUAGACCUCUCAGCTsT	1092	GCUGCAGAGGUCUAGGGUCTsT	27%	2%		
ND-10687	1093	ACCCUAGACCUCUCAGCCTsT	1094	GGCUGCAGAGGUCUAGGGUTsT	21%	1%		
ND-10688	1095	CAGCCCACGGCGGAGGGTsT	1096	CCUCCUCCGCCGUGGGCUGTsT	55%	4%		
ND-10689	1097	CUCUUCGAGUUCUUCUGCATsT	1098	UGCAGAAGAACUCGGAAGAGTsT	13%	3%		
ND-10690	1099	UUUGGAUGAUGUACUGGCATsT	1100	UGCCAGUACAUCAUGCCAAATsT	16%	2%		
ND-10691	1101	GGCAUGAUGUACUGGCAAUTsT	1102	AUUGCCAGUACAUCAUGCCCTsT	13%	1%		
ND-10692	1103	UGUACUGGCAAUUCGGCCUTsT	1104	AGGCCGAAUUGCCAGUACATsT	45%	2%		
ND-10693	1105	ACUGGCAAUUCGGCCUGCUTsT	1106	AGCAGGCCGAAUUGCCAGUTsT	38%	3%		

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10694	1107	GGCAAUUCGGCCUGCUUUUUsT	1108	AAAAGCAGCCGAAUUGCCTsT	10%	1%
ND-10695	1109	CAAUUCGGCCUGCUUUUCGTsT	1110	CGAAAAGCAGGCCGAAUUGTsT	12%	1%
ND-10696	1111	UCGGAGAGUAUUCAGCUATsT	1112	UAGCUGAAGUACUCUCCGATsT	12%	1%
ND-10697	1113	CAACAUCUGUCGAGGCCUGTsT	1114	CAGCCUCGACAGGAUUGTsT	35%	7%
ND-10698	1115	CAUCCUGUCGAGGCCUGCCATsT	1116	UGGCAGCCUCGACAGGAUGTsT	26%	6%
ND-10699	1117	UGCUGCAACCCAGCGAAUUsT	1118	AAUUCGCCUGGUUGCAGGATsT	28%	6%
ND-10700	1119	GGAAACUGCUAUACUUUCATsT	1120	UGAAAGUAUAGCAGUUUCCTsT	7%	2%
ND-10701	1121	ACGGUCUGUCCUGAUGCUTsT	1122	AGCAUCAGGGACAGCCGUTsT	28%	7%
ND-10702	1123	GGUCUGUCCUGAUGCUGTsT	1124	GCAGCAUCAGGGACAGACCTsT	33%	2%
ND-10703	1125	GGCCCGGUAAUUGGUGCACTsT	1126	GUGCACCAUUACCCGGGCCCTsT	47%	10%
ND-10704	1127	CAGGAUAACCCUGCCUUUATsT	1128	UAAAGGCAGGUUCAUCCUGTsT	59%	2%
ND-10705	1129	GAUGAACCUGCCUUUAUGGTsT	1130	CCAUAAGGCAGGUUCAUCTsT	77%	7%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10706	1131	GGUGCCUUUAACUUGCGGCTsT	1132	GCCGCAAGUUAAAAGCCACCTsT	47%	8%
ND-10707	1133	GUGGCUUUAAACUUGCGGCCCTsT	1134	GGCCGCAAGUUAAAAGCCACTsT	17%	2%
ND-10708	1135	UUGCGGCCUUGCGGUGGAGATsT	1136	UCUCCACGCCAGGCCGCAATsT	52%	3%
ND-10709	1137	UGCGCCUUGCGGUGGAGACTsT	1138	GUCUCCACGCCAGGCCGCGATsT	81%	4%
ND-10710	1139	GCGGCCUUGCGGUGGAGACCTsT	1140	GGUCUCCACGCCAGGCCGCGTsT	57%	4%
ND-10711	1141	CAGGUGUGUAUUCACUCCUTsT	1142	AGGAGUGAAUACACACCUUGTst	24%	2%
ND-10712	1143	GUGUAUUCACUCCUUCUUTsT	1144	GAAGCAGCAGUAAUACACTsT	20%	1%
ND-10713	1145	GGCCUCCGUGACAUCCCATsT	1146	UGGGAUGUCACCCGAGGCCCTsT	40%	3%
ND-10714	1147	GAUGCUAUCGCGACAGAACTsT	1148	GUUCUGUCGCGAUAGCAUCTsT	24%	2%
ND-10715	1149	ACUACAAAACCAAUUCUGATsT	1150	UCAGAAUUGGUUUUGUAGUTsT	19%	2%
ND-10716	1151	CAAUUCUGAGUCUCCUCUTsT	1152	AGAGGGAGACUCAGAAUUGTst	35%	3%
ND-10717	1153	CUCUGUCACGAUGGUCACCTsT	1154	GGUGACCAUCGUGACAGAGTst	41%	4%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10718	1155	CUGUCCGAAGGUUCCGAATsT	1156	UUCGGAACCUUCGGAGCAGTsT	16%	3%
ND-10719	1157	AGGUUCCGAAGCCGAUAUCUTsT	1158	AGUAUCGGCUUCGGAACCUtTsT	16%	2%
ND-10720	1159	GUUCCGAAGCCGAUAUCUGGTsT	1160	CCAGUAUCGGCUUCGGAACtTsT	21%	2%
ND-10721	1161	CGAAGCCGAUAUCUGGUCUCTsT	1162	GAGACCAGUAUCGGCUUCGtTsT	16%	1%
ND-10722	1163	AAGAUUGAAGGAUGUGCAGTsT	1164	CUGCACAUCCUUCAAUCUUtTsT	25%	2%
ND-10723	1165	GAUUGAAGGAUGUGCAGGGTsT	1166	CCCUGCACAUCCUUCAAUcTsT	26%	1%
ND-10724	1167	UGCCUCUGAACACUCUGGUTsT	1168	ACCAGAGUGUUCAGAGGCATsT	45%	3%
ND-10725	1169	CCUCUGAACACUCUGGUUUtTsT	1170	AAACCAGAGUGUUCAGAGGtTsT	15%	2%
ND-10726	1171	GACAAAGGAACUUCUUAAGTsT	1172	CUUAGAAAAGUUCUUGUcTsT	105%	14%
ND-10727	1173	CAGGACAAAACACAACCAATsT	1174	UUGGUUGUGUUUUGUCCUGtTsT	32%	5%
ND-10728	1175	AACACAACCAAGGGUACACTsT	1176	GUGUACCCUUGGUUGUGUUtTsT	60%	13%
ND-10729	1177	UUGAACUUGGGUGGGAAACTsT	1178	GUUUCACCACCAAGUUCAAATsT	23%	8%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM in H441; MV	SD
ND-10730	1179	UGAACUUGGGUGGAAACCTsT	1180	GGUUUCCCCACCAAGUUCATsT	18%	4%
ND-10731	1181	ACCCGUGCCCCUCACAGAGCTsT	1182	GCUCUGUGAGGGCACGGGUTsT	19%	1%
ND-10732	1183	ACUUAACAUCUGCUGGGAGTsT	1184	CUCCAGCAGAUGUUUAUAGUTsT	17%	5%
ND-10733	1185	AUCUGCUGGAGUGUUGCUGTsT	1186	CAGCAACACUCCAGCAGAUTsT	119%	20%
ND-10734	1187	CUGCUGGAGUGUUGCUGUUTsT	1188	AACAGCAACACUCCAGCAGTsT	58%	13%
ND-10735	1189	CUAGCCCAUCAUCCUGCUUTsT	1190	AAGCAGGAUGAUGGGCUAGTsT	20%	6%
ND-10736	1191	CUCUGGAUGUCUCCAUGCTsT	1192	GCAUGGAAGACAUCCAGAGTsT	28%	8%
ND-10737	1193	AGCAGGACCCUAGACCUCUTsT	1194	AGAGGUCUAGGGUCCUGCUTsT	36%	2%
ND-10738	1195	UUCGAGUUUCUUCUGCAACATsT	1196	UGUUGCAGAAGAACUCCGAATsT	13%	1%
ND-10739	1197	CACCAUCCACGGCGCCCAUCTsT	1198	GAUGGGCCCGUGGAUGGUGTsT	13%	2%
ND-10740	1199	CCACGGCGCCCAUCCGCCUGTsT	1200	CAGGGGAUGGGCCCGUGGTsT	44%	4%
ND-10741	1201	CAGCACAACCGCAUGAAGATsT	1202	UCUUCAUGCGGUUGUGCUGTsT	23%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10742	1203	CCUUUGGCAUGAUGUACUGTsT	1204	CAGUACAUGCCAAAGGTsT	12%	1%
ND-10743	1205	AUCCUGUCGAGGCCAGTsT	1206	CUGGCAGCCUCGACAGGAUTsT	14%	3%
ND-10744	1207	UCUCCUGCAACCAGGGGAATsT	1208	UUCGCCUGGUUGCAGGAGATsT	12%	1%
ND-10745	1209	UGCAACCAGGGCAAUUACUTsT	1210	AGUAAUUCGCCUGGUUGCATsT	45%	5%
ND-10746	1211	ACCUCCAUCAGCAUGAGGATsT	1212	UCCUCAUGCUGAUGGAGGUTsT	82%	7%
ND-10747	1213	GCGACUGCACCAAGAAUGTsT	1214	CCAUUUUJGGUGCAGUCGCTsT	82%	19%
ND-10748	1215	ACCAAGAAUUGCAGUGAUGTsT	1216	CAUCACUGCCAUUCUUGGUTsT	54%	18%
ND-10749	1217	UGGUUACUCACGAUGGCCCTsT	1218	GGCCCAUCGUGAGUAACCATsT	45%	7%
ND-10750	1219	AGAAAUGGAGUGGCCAAAAGTsT	1220	CUUUGGCCACUCCAUUUUCUTsT	11%	3%
ND-10751	1221	GGAGCUGAACUACAAAACCTsT	1222	GGUUUUGUAGUUACAGCUCCTsT	15%	3%
ND-10752	1223	CCUCUGUCACGAUGGUCACTsT	1224	GUGACCAUCGUGACAGAGGTsT	18%	5%
ND-10753	1225	AGAUUGAAGGAUGUCAGGTsT	1226	CCUGCACAUCCUCAAUCUTsT	26%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10754	1227	GAGCUUUGACAAAGGAACUUTsT	1228	AAGUCCUUGUCAAAAGCUCTsT	14%	2%
ND-10755	1229	CUUUGACAAGGAACUUUCCTsT	1230	GAAAGUUCCUUGUCAAAAGTsT	50%	8%
ND-10756	1231	UCAGACACCAUUACUUUUGTsT	1232	CAAAAGUAAUGGUGUCUGATsT	32%	4%
ND-10757	1233	AGCACACUAUAACAUCUGCTsT	1234	GCAGAUGUUUAUAGUGUGCUTsT	11%	2%
ND-10758	1235	GCACAACCGCAUGAAGACGTsT	1236	CGUCUUCAUGCGGUUGUGCTsT	34%	3%
ND-10759	1237	ACUGCUUCUACCAGACAUATsT	1238	UAUGUCUGGUAAGAAGCAGUTsT	11%	1%
ND-10760	1239	GAAGACGGCCUUCUGGGCATsT	1240	UGCCCAGAAAGGCCGUCUUCTsT	16%	2%
ND-10761	1241	AAGACGGCCUUCUGGGCAGTsT	1242	CUGCCCCAGAAAGGCCGUCUUTsT	58%	21%
ND-10762	1243	ACAUCAACCUCUACUCGGATsT	1244	UCCGAGUUAGAGGUUGAUGUTsT	14%	3%
ND-10763	1245	UGGAAGGACUGGAAGAUCGTsT	1246	CGAUCUCCAGUCCUCCATsT	109%	29%
ND-10764	1247	ACAUCCUGUCGAGGCUGCCTsT	1248	GGCAGCCUCGACAGGAUGUTsT	101%	13%
ND-10765	1249	CAACCAGCGAAUACUCUTsT	1250	AGAGUAAUCCGCCUGGUUGTsT	19%	5%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10766	1251	CAGGCGAAUUACUCUCACUTsT	1252	AGUGAGAGUAAUUCGCCUGTsT	24%	4%
ND-10767	1253	AGCAGAAUGACUUCUUCCTsT	1254	GGAUUGAAGUCAUUCUGCUTsT	40%	8%
ND-10768	1255	AUGAUGGUGGCUUUAAACUUTsT	1256	AAGUJAAAAGCCACCACCAUCAUTsT	85%	8%
ND-10769	1257	AGAACCUUUUACCCUUCAAATsT	1258	UUUGAAGGGUAAAAGGUUCUTsT	22%	4%
ND-10770	1259	CCUUUACCCUUCAAAAGUACTsT	1260	GUACUUUGAAGGGUAAAAGGTsT	21%	4%
ND-10771	1261	GAGCCUGUGGUUCGGCUCCTsT	1262	GGAGCCGAACCACAGGCUCTsT	28%	1%
ND-10772	1263	UGGUACUGCCUCUGAACACTsT	1264	GUGUUCAGAGGCAGUACCATsT	58%	4%
ND-10773	1265	CUCAUACCCGUGCCCUCACTsT	1266	GUGAGGGCACGGGUUAGAGTsT	15%	2%
ND-10774	1267	CCGUAGCACACUAUAACAUTsT	1268	AUGUUAUAGUGUGCUACGGTsT	24%	6%
ND-10775	1269	CGUAGCACACUAUAACAUTsT	1270	GAUGUUAUAGUGUGCUACCGTsT	21%	4%
ND-10776	1271	GCAGGACCCUAGACCUCUGTsT	1272	CAGAGGUCUAGGGUCCUGCTsT	25%	4%
ND-10777	1273	GCCUGCUUUUCGGAGAGUATsT	1274	UACUCUCCGAAAAAGCAGGCTsT	18%	4%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD
ND-10778	1275	GGCCCCGGJAAUUGGUGCATsT	1276	UGCACCAUUACCCGGCCCTsT	16%	2%
ND-10779	1277	CAACAACAAGAGAAAUGGATsT	1278	UCCAUUUCUCUUGUUGUUGTsT	17%	0%
ND-10780	1279	GCUGUUGCACCAUACUJUUCTsT	1280	GAAAGUAUGGUGCAACAGCTsT	14%	1%
ND-10781	1281	CUACCGAGAGCUCUUCGAGTsT	1282	CUCGAAGAGCUCUCGGUAGTsT	24%	3%
ND-10782	1283	ACCUGCCUUUAUGGAUGAUTsT	1284	AUCAUCCAUAAGGAGGAGTsT	115%	10%
ND-10783	1285	UUGACAAGGAACUUCCUATsT	1286	UAGGAAAGUUCUUGUCAATsT	16%	1%
ND-10784	1287	GCUGGAGUGUUGCUGUUUGTsT	1288	GCAACAGCAACACUCCAGCTsT	12%	1%
ND-10785	1289	UCGGUGACAUCCCAGGAUTsT	1290	AUUCCUGGGAUGUCACCCGATsT	28%	1%
ND-10786	1291	GCUGCCCAGAAUGCCUUGTsT	1292	CAAGGCACUUCUGGGCAGCTsT	15%	2%
ND-10787	1293	AGUACACACAGCAGGUGUGTsT	1294	CACACCUCUGUGUGUACUTsT	12%	1%
ND-10788	1295	CAAGUGCCGGAAAGCCAUGCTsT	1296	GCAUJGGUUCCGGCACUUGTsT	94%	2%

Tabla 1C: Los ARNi corto seleccionados en el conjunto sustituto in vivo (ARNi corto de reactividad cruzada de humano-rata con la más alta especificidad en rata). Se identificó un conjunto de cribado de 48 secuencias de alfa-ENaC por medio de ARNi de reactividad cruzada de humano y rata. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección independientes de una sola dosis (remítase a la sección de ejemplos para ver los métodos empleados).

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-9201	1297	uGuGcAAccAGAAcAAAucTsT	1298	GAUUUGUUCUGGUUGcAcATsT	8%	1%	8%	1%
ND-9202	1299	uuuAuGGAuGAGuGGuTsT	1300	AGCcAcAuCcAuAAATsT	80%	9%	82%	6%
ND-9203	1301	GccuuuAUGGAUGAuGGuTsT	1302	CACcAuCcAuAAAGGCTsT	76%	8%	76%	2%
ND-9204	1303	cACAAccGcAuGAAGAcGGTsT	1304	CCGUUCcAuUGCGGUUGUGTsT	73%	18%	57%	3%
ND-9205	1305	AccGcAuGAAAGAcGGccuuTsT	1306	AAGCCGUCUUCcAuUGCGGUTsT	35%	3%	37%	2%
ND-9206	1307	AGGAcuGGAAGAcuGGcuuTsT	1308	AAGCCGAUCUUCcAuAGUCCUTsT	17%	3%	16%	3%
ND-9207	1309	GAAGGAcuGGAAGAcuGGcTsT	1310	GCCGAUCUUCcAuAGUCCUUCTsT	96%	18%	81%	5%
ND-9208	1311	GGAcuGGAAGAcuGGcuuTsT	1312	GAAGCCGAUCUUCcAuAGUCCTsT	58%	6%	57%	3%
ND-9209	1313	AGuuccAccGcuuccuAccGTsT	1314	CGGuAGGAGCGGUUGGAACUTsT	85%	8%	94%	4%
ND-9210	1315	GAcuGGAAGAcuGGcuuccTsT	1316	GGAAGCCGAUCUUCcAuAGUCTsT	79%	5%	82%	2%
ND-9211	1317	cGcAuGAAAGAcGGccuuuTsT	1318	AGAAGCCGUCUUCcAuUGCGTsT	50%	1%	51%	1%
ND-9212	1319	GccAGuGGAGccuGuGGuuTsT	1320	AACcAcAGGCUCcAcUGGCTsT	26%	3%	23%	2%
ND-9213	1321	uGccuuuuAuGGAuGAGuGGuTsT	1322	AcAuCcAuAAAGGcATsT	77%	5%	76%	4%
ND-9214	1323	uccuGuccAAccuGGcAGTsT	1324	CUGCCcAGGUUGGAcAGGATsT	74%	9%	83%	6%
ND-9215	1325	AGGGAGuGGuAccGcuuccTsT	1326	GGAAGCGGuAccAcUCUCCUUTsT	79%	6%	89%	4%
ND-9216	1327	GGcuGuGccuAcAucuucuTsT	1328	AGAAGAUGuAGGcAcAGCCTsT	11%	1%	13%	1%
ND-9217	1329	GAAAuuAAAGAGGAcuGGTsT	1330	CcAGCUCUUCUUAAUUUUCTsT	84%	14%	78%	5%
ND-9218	1331	AcuGGAAGAcuGGcuuccATsT	1332	UGGAAGCCGAUCUUCcAGUTsT	50%	4%	55%	3%
ND-9219	1333	ccuGuccAAccuGGcAGcTsT	1334	GCUGCCcAGGUUGGAcAGGTsT	78%	6%	85%	5%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-9220	1335	ccuGccuuuAuGGAuGAGuGTsT	1336	cAuAUCcFuAAAGGcAGGTsT	76%	5%	77%	9%
ND-9221	1337	AaccGcAuGAAAGAcGGccuTsT	1338	AGCCGUCUUcAuGCGGUUTsT	79%	8%	66%	3%
ND-9222	1339	uGuccAAccuGGGcAGccATsT	1340	UGGCUGCCcAGGUUGGAcATsT	70%	4%	57%	4%
ND-9223	1341	GuccAAccuGGGcAGccAGTsT	1342	CUGGCUGCCcAGGUUGGACTsT	95%	10%	76%	4%
ND-9224	1343	AAuuAAAGAGGAGcuGGATsT	1344	UCcAGCUCcCUUUuAAUUUTsT	83%	6%	69%	2%
ND-9225	1345	GGAAAGAcuGGAAGAcuGGTsT	1346	CCGAUCUUcAGUCUUcCTsT	41%	2%	30%	2%
ND-9226	1347	GuGAGGGAGuGGuACCGcuTsT	1348	AGCGGuACcACUCCcUcACTsT	21%	1%	17%	0%
ND-9227	1349	AcuuuAAuGAcAAAGAcATsT	1350	UGUUcUUGcAUUGAAAGUTsT	13%	1%	10%	0%
ND-9228	1351	ucAAuGAcAAGAAcAAcucTsT	1352	GAGUUGUUcUUGcAUUGATsT	36%	2%	28%	0%
ND-9229	1353	cuuuAuGGAuGAGUUGGcTsT	1354	GCcAcAuAUCcAuAAAGTsT	24%	1%	20%	1%
ND-9230	1355	GccuGGcGuGGAGAccuccTsT	1356	GGAGGUcUcACGcCAGGCTsT				
ND-9231	1357	uGcGuG-GAGAccuccAucTsT	1358	GAUGGAGGUcUcACGcCAtsT	45%	4%	35%	2%
ND-9232	1359	GAGuuccAccGcuuccAccTsT	1360	GGuAGGAGCGGUcGGAACUCtsT	89%	4%	86%	8%
ND-9233	1361	cAGAGcAGAAuGAcuucAuTsT	1362	AUGAAGUcAUUCUGcUCUGTsT	21%	1%	17%	0%
ND-9234	1363	uucAcuccuGcuuccAGcATsT	1364	UCCUGGAAcAGGAGUGAAATsT	85%	4%	74%	6%
ND-9235	1365	ucAcuccuGcuuccAGGAGTsT	1366	CUCCUGGAAcAGGAGUGATsT				
ND-9236	1367	cuGuGcAAccAGAAcAAuTsT	1368	AUUUGUcUUGGUUGcAcAGTsT	23%	1%	17%	2%
ND-9237	1369	cuGcAAcAAcAccAucTsT	1370	GAUGGUGGUUGUUGcAGTsT	34%	2%	27%	2%
ND-9238	1371	uGuGGcuGuGccuAcAucTsT	1372	AGAUGuAGGcAcAGCCACATsT	86%	4%	73%	10%
ND-9239	1373	uGGuGuGccuAcAucucTsT	1374	GAAGAUGuAGGcAcAGCcATsT	68%	6%	53%	4%
ND-9240	1375	cuGuccAAccuGGGcAGccTsT	1376	GGCUGCCcAGGUUGGAcAGTsT	80%	5%	73%	9%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-9241	1377	cccuGcuGuccAcAGuGAcTsT	1378	GUcACUGUGGAcAGcAGGGTsT	83%	5%	71%	5%
ND-9242	1379	GcAGccAGuGGAGccuGuGTsT	1380	cAcAGGCUCcACUGGCUGCTsT	105%	9%	90%	5%
ND-9243	1381	uucAAuGACAAAGAAcAAcvcTsT	1382	AGUUGUUCUUUGUcAUUGAAATsT	23%	3%	21%	1%
ND-9244	1383	cuGccuuuAuGGAuGAuGGTsT	1384	CcAUcAUCcAuAAAGGcAGTsT	74%	6%	64%	7%
ND-9245	1385	AAuGAcAAGAAcAAcuccATST	1386	UGGAGUUGUUUCUUGUcAUUTsT	21%	1%	21%	1%
ND-9246	1387	uGGGcAGccAGuGGAGccuTsT	1388	AGGCUCcACUGGCUCGCCcATsT	83%	3%	73%	2%
ND-9247	1389	cuccuGuccAAccuGGGcATsT	1390	UGCCcAGGUUGGAcAGGAGTsT	86%	3%	84%	1%
ND-9248	1391	GGcGuGGAGAccuccAucATsT	1392	UGAUGGAGGUcUCcACGCCTsT	92%	4%	88%	3%

Tabla 1D: Los ARNI corto seleccionados en el conjunto sustituto de cobayo *in vivo* (ARNi corto de reactividad cruzada de humano-cobayo). Se identificó un conjunto de cribado de 63 secuencias de ARNI para alfa-ENaC de reactividad cruzada de humano y cobayo, y se sintetizaron, tanto con (cadenas de secuencias 1393 - 1518) como sin (cadenas de secuencias 1519 - 1644) modificación de la estructura base. Se muestra el porcentaje de expresión residual de alfa-ENaC en dos experimentos de transfección de una sola dosis independientes (referirse a la sección de ejemplos para ver los métodos empleados).

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8437	1393	AAucGGAcuGcuucuAccATsT	1394	UGGuAGAAAGcAGUCCGAUUUsT	48%	7%	46%	5%
ND8438	1395	AucGGAcuGcuucuAccAGTsT	1396	CUGGuAGAAAGcAGUCCGAUUUsT	85%	5%	93%	13%
ND8439	1397	AAAucGGAcuGcuucuAccTsT	1398	GGuAGAAAGcAGUCCGAUUUsT	36%	3%	42%	6%
ND8440	1399	ucGGAcuGcuucuAccAGATsT	1400	UCUGGuAGAAAGcAGUCCGATsT	45%	3%	50%	4%
ND8441	1401	AccAGAAcAAAucGGAcuGTsT	1402	cAGUCCGAUUUGUUCUGGUTsT	23%	3%	24%	6%
ND8442	1403	ccAGAAcAAAucGGAcuGcTsT	1404	GcAGUCCGAUUUGUUCUGGTsT	50%	6%	39%	9%
ND8443	1405	cAGAAcAAAucGGAcuGcuTsT	1406	AGcAGUCCGAUUUGUUCUGTsT	22%	2%	24%	1%
ND8444	1407	cuucGccuGccGcuucAAcTsT	1408	GUUGAAAGCGGcAGGCGAAGTsT	111%	6%	109%	4%
ND8445	1409	uGGuAccGcuuccAcuAcATsT	1410	UGuAGUGGAAGCGGGuAcATsT	84%	7%	97%	13%
ND8446	1411	AucuucGccuGccGcuucATsT	1412	UGAAAGCGGcAGGCGAAGAUUsT	90%	3%	121%	13%
ND8447	1413	uucGccuGccGcuucAAcTsT	1414	GGUUGAAAGCGGcAGGCGAATsT	92%	2%	105%	17%
ND8448	1415	cAcccuAAuccuAcAGGTsT	1416	CCUGuAGGGAUUGAGGGUGTsT	79%	3%	90%	13%
ND8449	1417	AGAAcAAAucGGAcuGcuTsT	1418	AAGcAGUCCGAUUUGUUCUTsT	11%	0%	17%	3%
ND8450	1419	GAAcAAAucGGAcuGcuucTsT	1420	GAAcAGUCCGAUUUGUUCUUsT	21%	1%	30%	5%
ND8451	1421	cGGAcuGcuucuAccAGAcTsT	1422	GUCUGGuAGAAAGcAGUCCGUsT	24%	2%	32%	5%
ND8452	1423	AGccuAAcAucAaccuATsT	1424	UGAGGUUGAUUGUAGGCUUsT	51%	3%	57%	4%
ND8453	1425	GccuAAcAucAaccuAATsT	1426	UUGAGGUUGAUUGUAGGCUUsT	16%	1%	26%	3%
ND8454	1427	GucAGccuAAcAucAAccTsT	1428	GGUUGAUUGUUGAGGCUGACTsT	62%	5%	68%	6%
ND8455	1429	ucAGccuAAcAucAAccuTsT	1430	AGGUUGAUUGUUGAGGCUGATsT	77%	4%	87%	6%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8456	1431	cAGccucAAcAucAAccucTsT	1432	GAGGUUGAUGUUGAGGCGUGTsT	34%	2%	51%	8%
ND8457	1433	GGAGcuGGAccGcAucAcATsT	1434	UGUGAUGCGGUCcAGCUCCTsT	26%	2%	17%	1%
ND8458	1435	GuAccGcuuccAcuAcAucTsT	1436	GAUGuAGUGC <sub>T</sub> AAGCCGGuACTsT	101%	9%	99%	11%
ND8459	1437	ccGcuuccAcuAcAucAAcTsT	1438	GUUGAUGuAGUGGAAAGCGGTsT	85%	8%	80%	6%
ND8460	1439	cGcuuccAcuAcAucAAcATsT	1440	UGUUGAUGuAGUGGAAAGCGGTsT	56%	6%	48%	3%
ND8461	1441	uuccAcuAcAucAAcAuccTsT	1442	GGAUUUUGAUGuAGUGGAAATsT	77%	5%	82%	7%
ND8462	1443	uGGGcAAcuuAcuuccGcTsT	1444	GCGAAGAUGAAGUUGCCcATsT	21%	0%	36%	6%
ND8463	1445	GcAAcuuAcuuccGccuGTsT	1446	cAGCGAAGAUGAAGUUGCTsT	80%	4%	84%	13%
ND8464	1447	cAAcuuAcuuccGccuGcTsT	1448	GcAGCGAAGAUGAAGUUGTsT	101%	1%	102%	14%
ND8465	1449	AAcuuAcuuccGccuGccTsT	1450	GGcAGCGGAAGAUGAAGUUTsT	100%	4%	95%	12%
ND8466	1451	AcuuAcuuccGccuGccGTsT	1452	CGGcAGCGGAAGAUGAAGUTsT	51%	4%	49%	5%
ND8467	1453	cuuAcuuccGccuGccGcTsT	1454	GCGGcAGCGGAAGAUGAAGTsT	95%	5%	89%	4%
ND8468	1455	ucAucuucGccuGccGcuuTsT	1456	AAGGGcAGCGGAAGAUGATsT	91%	4%	85%	6%
ND8469	1457	cAucuucGccuGccGcuuTsT	1458	GAAAGCGcAGCGGAAGAUGTsT	66%	4%	55%	4%
ND8470	1459	ucuucGccuGccGcuuAAATsT	1460	UUGAAGCGGcAGCGGAAGATsT	97%	2%	99%	11%
ND8471	1461	cGccuGccGcuuAcAccAGTsT	1462	CUGGUUGAAGCGGcAGGCGTsT	96%	4%	100%	7%
ND8472	1463	GccuGccGcuuAcAccAGGTsT	1464	CCUGGUUGAAGCGGcAGGCTsT	90%	4%	82%	5%
ND8473	1465	AuuAcucAcuuccAccATsT	1466	UGGUUGAAGUGAGAGuAAUTsT	81%	3%	72%	4%
ND8474	1467	uuAcucAcuuccAccActTsT	1468	GUGGUUGAAGUGAGAGuAAATsT	72%	2%	76%	9%
ND8475	1469	AcucAcuuccAccAccTsT	1470	GGGUUGGAAAGUGAGAGUTsT	90%	3%	97%	4%
ND8476	1471	ucuGcAccuccAAuuccuATsT	1472	uAGGGAUUGAGGGUGcAGATsT	61%	1%	63%	3%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8477	1473	cuGcAcccuAAuuccuAcTsT	1474	GuAGGGAUUGAGGGUGcAGTsT	74%	3%	73%	1%
ND8478	1475	uGcAcccuAAuuccuAcATsT	1476	UGuAGGGAUUGAGGGUGcATsT	98%	4%	85%	1%
ND8479	1477	AcccuAAuuccuAcAGGuTsT	1478	ACCUGuAGGGAUUGAGGGUUTsT	55%	5%	48%	3%
ND8480	1479	ccucAAuuccuAcAGGuATsT	1480	uACCUGuAGGGAUUGAGGGTsT	20%	1%	14%	1%
ND8481	1481	ccucAAuuccuAcAGGuAcTsT	1482	GuACCUGuAGGGAUUGAGGGTsT	40%	2%	31%	3%
ND8482	1483	AAccAGAAcAAAuuccuAcTsT	1484	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUTsT	57%	2%	52%	0%
ND8483	1485	AAcAAAuuccuAcGcuuAcTsT	1486	AGAAcAGUCCGAUUUGUUTsT	102%	5%	86%	12%
ND8484	1487	AcAAAuuccuAcGcuuAcTsT	1468	uAGAAcAGUCCGAUUUGUUTsT	40%	2%	28%	3%
ND8485	1489	cAAAuuccuAcGcuuAcTsT	1490	GuAGAAcAGUCCGAUUUGUUTsT	41%	4%	38%	2%
ND8486	1491	GcAcccuAAuuccuAcAGTsT	1492	CUGuAGGGAUUGAGGGUGCTsT	91%	7%	94%	4%
ND8487	1493	ccucAAcAucAAccuAAcTsT	1494	GUUGAGGUUGAUUGAGGGTsT	46%	2%	37%	3%
ND8488	1495	cucAAcAucAAccuAAcTsT	1496	AGUUGAGGUUGAUUGAGTsT	48%	2%	39%	3%
ND8489	1497	ucAAcAucAAccuAAcTsT	1498	GAGUUGAGGUUGAUUGAGTsT	17%	1%	17%	1%
ND8490	1499	uAccGcuuAcuAcAucATsT	1500	UGAUGuAGUGGAAcGcGGuATsT	90%	5%	74%	8%
ND8491	1501	AccGcuuAcuAcAucAATsT	1502	UUGAUuAGUGGAAcGcGGuTsT	103%	5%	91%	15%
ND8492	1503	GcuuAcuAcAucAAcAuTsT	1504	AUGUUGAUuAGUGGAAcGcTsT	85%	5%	71%	10%
ND8493	1505	cuuAcuAcAucAAcAuTsT	1506	GAUGUUGAUuAGUGGAAcGcTsT	60%	5%	45%	3%
ND8494	1507	uccAucAucAAcAuuccuTsT	1508	AGGAUGUUGAUuAGUGGATsT	33%	3%	41%	3%
ND8495	1509	ccAucAucAAcAuuccuGTsT	1510	cAGGAUGUUGAUuAGUGGATsT	60%	5%	55%	2%
ND8496	1511	cuGGGcAAcuuAcuuccuGTsT	1512	CGAAcGAUGAUGUUGcCAGTsT	18%	0%	20%	0%
ND8497	1513	GGcAAcuuAcuuccuGcuuTsT	1514	AGGcGAUGAUGAUGUUGcCCTsT	76%	1%	77%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND8498	1515	uucAucuucGccuGccGcuTsT	1516	AGCGGAGCGGAAGAUAATsT	65%	4%	74%	12%
ND8499	1517	ucGccuGccGcuucAAccATsT	1518	UGGUUGAAGCGGcAGGGATsT	86%	5%	77%	3%
ND-8653	1519	AAUCGGACUGCUUCUACCATsT	1520	UGGUAGAAGCAGUCCGAUUTsT	16%	2%	20%	3%
ND-8654	1521	AUCGGACUGCUUCUACCATsT	1522	CUGGUAGAAGCAGUCCGAUUTsT	54%	8%	67%	11%
ND-8655	1523	AAAUCGGACUGCUUCUACCTsT	1524	GGUAGAAGCAGUCCGAUUTsT	25%	4%	28%	2%
ND-8656	1525	UCGGACUGCUUCUACCATsT	1526	UCUGGUAGAAGCAGUCCGATsT	12%	2%	17%	1%
ND-8657	1527	ACCAGAACAAAUCGGACUGTsT	1528	CAGUCCGAUUUGUUCUGGUTsT	33%	3%	35%	1%
ND-8658	1529	CCAGAACAAAUCGGACUGCTsT	1530	GCAGUCCGAUUUGUUCUGGTsT	27%	3%	30%	2%
ND-8659	1531	CAGAACAAAUCGGACUGCTsT	1532	AGCAGUCCGAUUUGUUCUGTsT	15%	1%	22%	3%
ND-8660	1533	CUUCGCCUGCCGCUUCAACTsT	1534	GUUGAAGCGGCAGGCCGAAGTsT	69%	17%	75%	10%
ND-8661	1535	UGGUACCGCUUCCACUACATsT	1536	UGUAGUGGAAGCGGUACCATsT	16%	2%	20%	3%
ND-8662	1537	AUCUUCGCCUGCCGCUUCACTsT	1538	UGAAGCGGCAGGCCGAAGTsT	19%	2%	25%	4%
ND-8663	1539	UUCGCCUGCCGCUUCAACTsT	1540	GGUUGAAGCGGCAGGCCGAATsT	90%	4%	97%	10%
ND-8664	1541	CACCCUCAAUCCCUACAGGTsT	1542	CCUGUAGGGAUUGAGGGUGTsT	19%	2%	25%	3%
ND-8665	1543	AGAACAAAUCGGACUGCUUTsT	1544	AAGCAGUCCGAUUUGUUCUTsT	13%	1%	22%	2%
ND-8666	1545	GAACAAAUCGGACUGCUUCTsT	1546	GAAGCAGUCCGAUUUGUUCUTsT	11%	2%	18%	2%
ND-8667	1547	CGGACUGCUUCUACCCAGACTsT	1548	GUCUGGUAGAAGCAGUCCCGTsT	13%	1%	16%	2%
ND-8668	1549	AGCCUCAACAUAACCCUCATsT	1550	UGAGGUUGAUGUUGAGGGCUTsT	17%	4%	21%	3%
ND-8669	1551	GCCUCAACAUAACCCUCAATsT	1552	UUGAGGUUGAUGUUGAGGGCTsT	13%	1%	21%	3%
ND-8670	1553	GUCAGCCUCAACAUAACCCTsT	1554	GGUUGAUGUUGAGGGCUGACTsT	43%	11%	27%	3%
ND-8671	1555	UCAGCCUCAACAUAACCCUTsT	1556	AGGUUGAUGUUGAGGGCUGATsT	90%	17%	53%	13%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8672	1557	CAGCCUACAACAACCUCTsT	1558	GAGGUUGAUGUAGGCCUGTsT	17%	3%	11%	3%
ND-8673	1559	GGAGCUGGACCGCAUCACATsT	1560	UGUGAUGCGGUCCAGCUCCTsT	25%	3%	18%	3%
ND-8674	1561	GUACCGCUUCCACUACAUGTsT	1562	GAUGUAGUGGAAGCGGUACTsT	21%	4%	16%	4%
ND-8675	1563	CCGCUUCCACUACAUAACTsT	1564	GUUGAUGUAGUGGAAGCGGTsT	25%	4%	19%	3%
ND-8676	1565	CVCUUCACACUACAUAACATsT	1566	UGUUUGAUGUAGUGGAAGCGTsT	16%	3%	14%	1%
ND-8677	1567	UCCACUACAACAACUCCTsT	1568	GGUUGUUGAUGUAGUGGAATsT	110%	19%	97%	9%
ND-8678	1569	UGGCAACUUCAUUCUGCTsT	1570	GCGAAGAUGAAGUUGCCCATsT	50%	8%	40%	5%
ND-8679	1571	GCAACUUAUCUUCGCCUGTsT	1572	CAGCGAAGAUGAAGUUGCTsT	19%	3%	17%	2%
ND-8680	1573	CAACUUAUCUUCGCCUGTsT	1574	GCAGCGAAGAUGAAGUUGTsT	25%	2%	23%	2%
ND-8681	1575	AACUUAUCUUCGCCUGCTsT	1576	GGCAGCGAAGAUGAAGUUTsT	104%	7%	85%	10%
ND-8682	1577	ACUUAUCUUCGCCUGCGTsT	1578	CGGCAGCGAAGAUGAAGUTsT	91%	8%	63%	9%
ND-8683	1579	CUUCAUCUUCGCCUGCGTsT	1580	GCGCAGCGAAGAUGAAGTsT	88%	6%	58%	6%
ND-8684	1581	UCAUCUUCGCCUGCCUUTsT	1582	AAGCGCAGCGAAGAUGATsT	76%	3%	64%	4%
ND-8685	1583	CAUCUUCGCCUGCCUUCTsT	1584	GAAGCGCAGCGAAGAUGTsT	15%	1%	18%	3%
ND-8686	1585	UCUUCGCCUGCCGUCAATsT	1586	UUGAAGCGCAGCGAAGATsT	109%	22%	31%	3%
ND-8687	1587	CGCCUGCCGUUCAACCAGTsT	1588	CUGGUUGAAGCGGCAGCGTsT	90%	21%	49%	2%
ND-8688	1589	GCCUGCCGUUCAACCAGTsT	1590	CCUGGUUGAAGCGGCAGGCTsT	43%	9%	24%	7%
ND-8689	1591	AUUACUCACUUCACCCTsT	1592	UGGUUGAAGUGAGAGUAAUTsT	27%	4%	19%	2%
ND-8690	1593	UUACUCACUUCACCCTsT	1594	GUGGUUGAAGUGAGAGUAAATsT	109%	7%	85%	8%
ND-8691	1595	ACUCUCACUUCACCCTsT	1596	GGGUGGUUGAAGUGAGAGUTsT	93%	11%	87%	12%
ND-8692	1597	UCUGCACCCUCAAUCCCUATsT	1598	UAGGGAUUGAGGGUGCAGATsT	31%	12%	17%	2%

(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8693	1599	CUGCACCCUCAAUCCCUACTsT	1600	GUAGGGAUUGAGGGUGCAGTsT	41%	25%	31%	4%
ND-8694	1601	UGCACCCUCAAUCCCUACTsT	1602	UGUAGGGAUUGAGGGUGCATsT	75%	25%	43%	3%
ND-8695	1603	ACCCUCAUCCGUACAGGUTsT	1604	ACCUGUAGGGAUUGAGGGUTsT	65%	26%	25%	5%
ND-8696	1605	CCUCAAUCCCUACAGGUATsT	1606	UACCUGUAGGGAUUGAGGGTsT	18%	2%	13%	1%
ND-8697	1607	CCUCAAUCCCUACAGGUACTsT	1608	GUACCUGUAGGGAUUGAGGGTsT	16%	4%	13%	2%
ND-8698	1609	AACCAGAACAAAUCGGACUTsT	1610	AGUCCGAUUUGUUCUGGUUTsT	40%	2%	30%	2%
ND-8699	1611	AACAAAUCGGACUGCUUCUTsT	1612	AGAAGCAGUCCGAUUUGUUTsT	56%	4%	45%	3%
ND-8700	1613	ACAAAUCGGACUGCUUAATsT	1614	UAGAAAGCAGUCCGAUUUGUTsT	18%	3%	12%	1%
ND-8701	1615	CAAAUCGGACUGCUUAATsT	1616	GUAGAAGCAGUCCGAUUUGTsT	15%	2%	15%	4%
ND-8702	1617	GCACCCUCAAUCCCUACAGTsT	1618	CUGUAGGGAUUGAGGGUGCTsT	53%	4%	46%	20%
ND-8703	1619	CCUCAACAUAACCCUCAACTsT	1620	GUUGAGGUUGAUUGUAGGGTsT	25%	6%	26%	9%
ND-8704	1621	CUCAACAUAACCCUCAACUTsT	1622	AGUUGAGGUUGAUUGUAGTsT	30%	8%	37%	26%
ND-8705	1623	UCAACAUAACCCUCAACUCsT	1624	GAGUUGAGGUUGAUUGUAGTsT	55%	1%	50%	10%
ND-8706	1625	UACCGCUUCCACUAACAUCATsT	1626	UGAUGUAGUGGAAGCGGUATsT	36%	7%	31%	7%
ND-8707	1627	ACCGCUUCCACUAACAATsT	1628	UUGAUGUAGUGGAAGCGGUTsT	23%	5%	27%	10%
ND-8708	1629	GCUUCCACUAACAUAACATsT	1630	AUGUUGAUGUAGUGGAAGCTsT	16%	4%	24%	12%
ND-8709	1631	CUUCCACUAACAUAACAUCsT	1632	GAUGUUGAUGUAGUGGAAGTsT	62%	3%	74%	27%
ND-8710	1633	UCCACUAACAUAACAUCCTsT	1634	AGGAUGUUGAUGUAGUGGATsT	45%	8%	41%	1%
ND-8711	1635	CCACUACAUAACAUAUCUGTsT	1636	CAGGAUGUUGAUGUAGUGGTsT	23%	4%	27%	10%
ND-8712	1637	CUGGGCAACUUAUCAUUCGTsT	1638	CGAAGAUGAAGUUGCCAGTsT	34%	4%	26%	5%
ND-8713	1639	GGCAACUUAUCAUUCGCCUTsT	1640	AGCGAAGAUGAAGUUGCCTsT	30%	3%	23%	2%



(continuación)

ID del Dúplex	Seq ID	Sentido	Seq ID	Antisentido	Dosis única del 1er cribado @ 50 nM en H441; MV	SD	2do cribado @ 50 nM en H441	SD
ND-8714	1641	UUCAUCUUCGCCUGCCGCUtTsT	1642	AGCGCAGGCCGGAAGAUGAA TsT	90%	14%	85%	14%
ND-8715	1643	UCGCCUGCCCGCUUCAACCATsT	1644	UGGUUGAAGCCGCCAGCGCGATsT	23%	2%	20%	4%

## ES 2 432 643 T3

Tabla 2A: Concentración en una inhibición del 50% (IC50) para los agentes de ARNi de ejemplo de la Tabla 1A.

ID del Dúplex	IC50 [nM]	
	1er DRC en	2do DRC en
	H441	H441
ND8294	0,1949	0,0468
ND8295	0,1011	0,0458
ND8299	0,5986	0,5638
ND8302	0,0144	0,0134
ND8313	0,0315	0,0124
ND8320	0,0796	0,0078
ND8331	0,0213	0,0158
ND8332	0,0205	0,0089
ND8343	0,0523	0,0293
ND8348	0,0156	0,0182
ND8356	0,0241	0,0099
ND8357	0,0054	0,0032
ND8363	0,1186	0,0337
ND8368	0,0487	0,1209
ND8371	0,0811	0,0911
ND8372	0,0584	0,0425
ND8373	0,0066	0,0165
ND8375	0,1176	0,1187
ND8380	0,6817	0,5747
ND8381	0,0037	0,0041
ND8383	0,0275	0,1257
ND8384	0,0357	0,0082
ND8391	0,0260	0,0349
ND8392	0,3831	0,4775
ND8396	0,0023	0,0052
ND8403	0,0808	0,0759

Tabla 2B: Concentración en una inhibición del 50% (IC50) y para los agentes de ARNi de ejemplo de la Tabla 1D.

ID del Dúplex	IC50 [nM]	
	1er DRC en	2do DRC en
	H441	H441
ND8441	0,6738	0,8080
ND8443	0,0346	0,0263
ND8449	0,0120	0,0067
ND8450	0,0257	0,0106
ND8451	0,1320	0,0931
ND8453	0,0079	0,0033
ND8489	0,1640	0,1593
ND8496	0,0387	0,0185

Tabla 2C: Porcentaje de actividad del ARNi de ejemplo hacia la inhibición de la expresión del gen para alfa-ENaC en los ensayos descritos en el Ejemplo 3.

Identificador del dúplex	% de expresión de alfa-ENaC en HBEC primario (% de control) ARNi corto 50 nM	Expresión de alfa-ENaC de cinomólogo (% de control) ARNi corto 45nM
No transfectado	77,2	n/a
Control no direccionado	100	93,3
Control negativo (sin alfa-ENaC de cinomólogo) ND8449	n/a	100
ND-8302	30,2	57
ND-8332	24,7	54,3
ND-8348	40,1	56,2
ND-8356	36,6	55,8
ND-8357	29,6	50,4
ND-8373	30,4	53,8
ND-8381	32,5	40,4
ND-8396	34,1	46,3
ND-8450	45,9	78,9
ND-8453	30,1	55,3

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente de ARNi que contiene una cadena sentido y una cadena antisentido, en donde:
- 5 a. la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8453 (SEQ ID NO: 1425 ), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de ND8453 (SEQ m NO: 1426 ), o
- b . la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8489 (SEQ ID NO: 1497), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de ND8489 (SEQ m NO: 1498); o
- 10 c . la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de ND8456 (SEQ ID NO: 1431), y la cadena antisentido comprende al menos 19 nucleótidos de la cadena antisentido de ND8456 (SEQ ID NO: 1432).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena sentido es de 30 o menos nucleótidos de longitud, y en donde la cadena sentido y la cadena antisentido forman una región dúplex de 15 a 30 pares de nucleótidos de longitud.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1, en donde la cadena antisentido y la cadena sentido son cada una de 19 a 23 nucleótidos de longitud.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende una modificación que provoca que el agente de ARNi tenga una mayor estabilidad en una muestra biológica.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende un fosforotioato o un nucleótido modificado en 2'.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende:
- 25 al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; o al menos un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende una modificación 2' seleccionada a partir del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxi-etilo (2'-O-MOE), 2'-O-amino-propilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetil-amino-etilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetil-amino-propilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetil-amino-etiloxi-etilo (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metil-acetamido (2'-O-NMA).
- 30 8. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende un extremo romo.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende un nucleótido que sobresale que tiene de 1 a 4 nucleótidos no aparejados.
- 35 10. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi comprende un nucleótido que sobresale en el extremo 3' de la cadena antisentido del agente de ARNi.
11. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi es ND8453 (SEQ ID NOs: 1425 y 1426).
12. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi es ND8489 (SEQ ID NOs: 1497 y 1498).
13. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi es ND8456 (SEQ ID NOs: 1431 y SEQ ID NO: 1432).
- 40 14. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente de ARNi está ligado a uno o más compuestos de diagnóstico, grupo reportero, agente de entrecruzamiento; fracción que confiera resistencia a la nucleasa, nucleobase natural o inusual, molécula lipofílica, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado de epifriedelanol, vitamina, carbohidrato, dextrano, pululano, quitina, quitosano, carbohidrato sintético, Oligo Lactato de 15 mer, polímero natural, polímero de

peso molecular bajo o medio, inulina, ciclodextrina, o ácido hialurónico, proteína, agente enlazante de proteína, molécula destinada a la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitación de péptido, y/o transferrina.

15. Una composición que comprende un agente de ARNi para alfa-ENaC, en donde el agente de ARNi comprende una cadena sentido y una cadena antisentido,

5 en donde la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena sentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8453 (SEQ ID NO: 1425), ND8489 ( SEQ ID NO: 1497), y ND8456 ( SEQ ID NO: 1431), y

10 en donde la cadena sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la cadena antisentido de un agente de ARNi seleccionado del grupo que consiste de ND8453 (SEQ ID NO: 1426); ND8489 (SEQ ID NO: 1498), y ND8456 (SEQ ID NO: 1432),

la composición comprende además un ligando del receptor epitelial.

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

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

15 18. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 15 para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por disfunción del canal de sodio epitelial seleccionada de: fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, infección del tracto respiratorio, carcinoma pulmonar, síndrome de Liddles, hipertensión, insuficiencia renal y desequilibrio de electrolitos.

Figura 1:

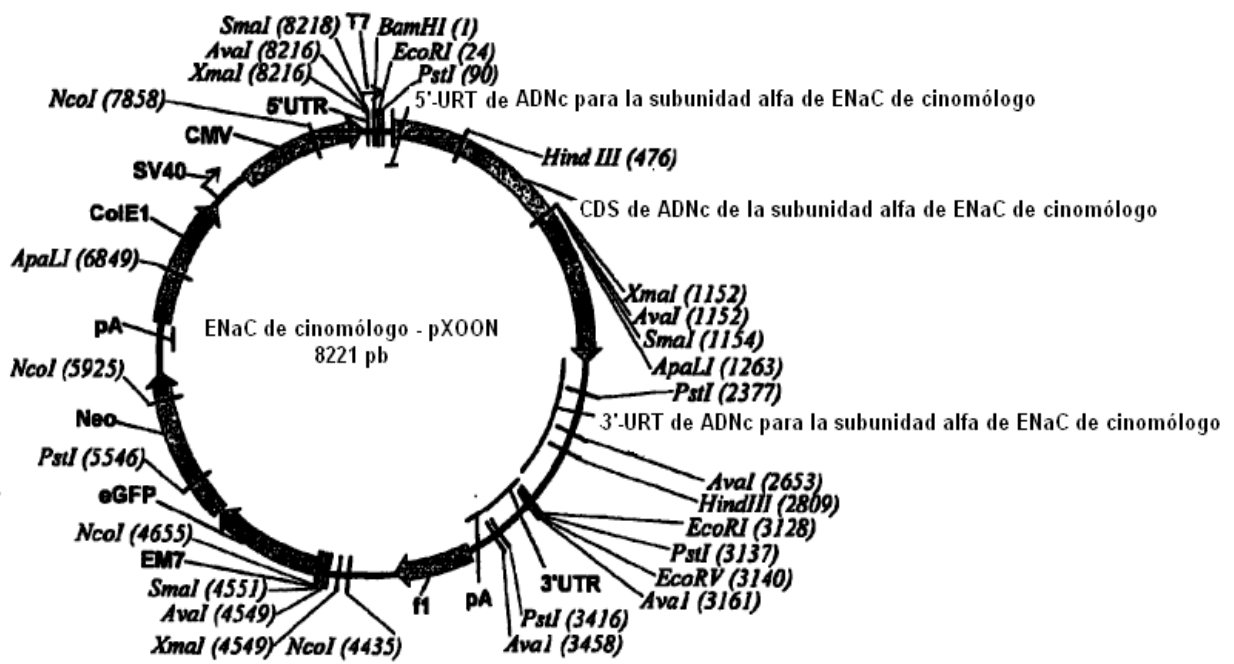


Figura 2...

SEQ.I.D.NO:1682

**GAATTCGCCCTTGGCCGCTGCACCTGTAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGA**  
 CCCTAGACCTCTGCAGCCCACCGCAGGGCTCATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCA  
 GGACGCTAGCCCTCCACAGCCCACCCAGGGCTCATGAAGGGGGACAAGCGTGAGGA  
 GCAGGGGCTGGGCCAGAACCTGCGGCACCCAGCAGCCCACGGCGGAGGAGGAGGC  
 CCTGATCGAGTTCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAGTCTTCTGCAACAATAC  
 CACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCAGCACAACCGCATGAAGACGGC  
 CTTCTGGGCAGTGCTCTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTCGGCCT  
 GCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCGGA  
 CAAGCTTGTCTTCCCCGCAGTGACCATCTGCACCCCTCAATCCCTACAGGTATCCGGA  
 AATTAAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACACAGCAGACGCTCTTTGACCT  
 GTACAAATACGACTCCTCCCCACCCCTCGTGGCCGGCTCCCGGGCCGTCGTGACCT  
 GCGGGGCACTCTGCCGCACCTCTTGCAGCGCTGAGGGTCCCGTCCCCGCTTCACGG  
 GGCCCGTCAAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCGTGCGGGACAACAACCCCAAGTGGA  
 CTGGAAGGACTGGAAGATCGGTTTCGAGCTGTGCAACCAGAACAATCAGACTGCTT  
 CTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCAGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTA  
 CATCAACATCCTGTGCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACT  
 GGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTA  
 CTCTCACTTCCACCACCAATGTATGGAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAA  
 CTCTAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAGTCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCT  
 GCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGGT  
 AATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCG  
 GCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAGCCCTGGACAGACTTGGGGG  
 CGACTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTCCCTGTCAAGAACCTTTACCC  
 TTCAAAGTACACGCAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAACATGATCAA  
 GGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCGAGAACATGGAGTACTGTGA  
 CTACAGGAAGCACAGTTCCTGGGGCTACTGCTACTATAAGCTCCAGGCTGACTTCTC  
 CTCAGACCACCTGGGCTGTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGTGTGACCAGCTA  
 CCAGCTCTCGGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTT  
 CGAGATGCTATCGCGACAGAACAACCTACACCATCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGC  
 CAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATCTGAGTCTCCCTC  
 TGTACGATGGTCACCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCCG  
 CTCCTCAGTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCATCTTTGACCTGCTGGTCAT  
 CACATTCTCCTGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGG  
 GGACAGGGGTGCTCAGGAGGTGGCCTCCACCCAGGCATCTCCCCGCCTTCCCACTT

CTGCCCCACCCACATCTCTGTACTTGTCCCAACTAGGCCCTGCTCCCTCCCCAGC  
 CTTGACAGCCCCCTCCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCCCTGCCCATCTCCAGGGGG  
 CTCCGCAGGGGCCAGCTCCACTGCCTATCCTCTGGGGGGGCCCTGAGAGAGGAGAGG  
 TTCTTGCACCAAGGCAGATGCTCCCCCTGGTGGGAGGGTGCTGCCCTTGGCAAGATT  
 GAAGGATGTGCAGGGCTTCTCTCAGAGCCGCCAAACTGCCCTTGATGTGTGGAGG  
 GGAAGCGAGATGGGTAAGGGGCTCAGGAAGTTGTTCCAAGAACAGTGGCCAATGAAG  
 CTGCCAGAAGTGCCTTGGCTCTGGCTCTGTACCCCTTGGTACTGCCTCTGAACACT  
 CTGGTTTCCCCACCCAACTGCAGCTAAGTCTCCTTTTCCCTTGGATCAGCCAAGCCA  
 AACTTGGAGCTTTGACAAGGAACTTTCTAAGAAATGGCTGATGACCAGGACAAAAC  
 ACAACCAAGGGTACACACAGGCATGCACGCGTTTCTGCCTGGCGACAGGTGAAGCC  
 AGCCCCTGACTGACCTGGCCACACTGCTCTCCAGTAACACAGATGTCTGCCCTCAT  
 CTTGAACTTGGGTGGGAAACCCACCCAAAAGCCCCCTTTATTACTTAGGCAATTCC  
 CCTTCCCTGACTCCCAGAGCCAGGGCCAGAGCAGACCCGTATAAGTAAAGGCAGCT  
 CCAGGGCTCCTCTAGGCTCATACCCGTGCCCTCACAGAGCCATGCTCCAGCGCTTCT  
 GTCCTGTGTCTTTCGTCCCTCTACATGTCTGCTCAAGACATTTTCTCAGCCTGAAAG  
 CTTCCCAGCCATCTGCCGGAGAACTCCTATGCATCCCTCAGAACCCTGCTCAGACA  
 CCATTACTTTTGTGAAGGCTTCTGCCACATCTTGTCTGCCAAAAAATTGATCACTCC  
 CCTTCTGGTGGGCTCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTGCTGTTGCA  
 CCATACTTCTTGTACGTTTGTGTCTGCCTCCCCAACTGGACTGTGAGGGCCTTGTG  
 GCCAGGGACTGAGTCTTGCCCGTTTATGTATGCTCCGTGTCTAGCCCATCATCCTGC  
 TTGAAGCAAGTAGGCAGATGCTCAAAGGGC**GAATTCTGCAGATATC**

Traducción:

SEQ. I. D. NO: 1681

MEGNKLEEQDASPPQPTPGLMKGDKREEQGLGPEPAAPQQPTAEEEEALIEFH  
 RSYRELFEFFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEY  
 FSYPVSLNINLNSDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITQQTLFDLYKYS  
 SPTLVAGSRGRRDLRGTLPHLLQRLRVPSPLHGARQARSVASSVRDNNPQVDWKDWK  
 IGFELCNQNKSDCFYQTYSSGVDVAVREWYRFHYINI LSRLPETLPSLEEDTLGNFIF  
 ACRFNQVSCNQANYSHFHHPMYGNCYTFNDKNNNSNLWMSMPGVNGLSLMLRTEQN  
 DFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPAFMDDGGFNLRPGVETSI SMRKEALDRLGGDYGDC  
 TKNQSDVPVKNLYPSKYTQQVCIHSCFQENMIKECGCAYIFYPRPQNMEYCDYRKHS  
 SWGYCYKQLQADFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFEMLSR  
 QNNYTINNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLNLGSLWQSLWFGSSVLS  
 VVEMAELIFDLLVITFLLLLRRFRSRYWSPGRGDRGAQEVASTQASSPPSHFCPHPT  
 SLYLSQLGPAPSPALTAPPPAYATLGPCPSPGGSAGASSTAYPLGGP



**Figura 3**

