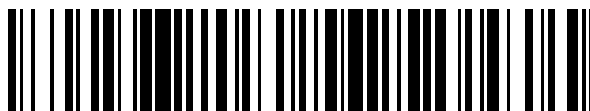


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 204**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 3/12 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 11715243 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2561077**

54 Título: **Composiciones orgánicas para tratar enfermedades relacionadas con beta-ENaC**

30 Prioridad:

11.05.2010 US 333398 P

23.04.2010 US 327379 P

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION
(100.0%)
225 South Lake Avenue, Suite 1050
Pasadena, CA 91101, US**

72 Inventor/es:

**DE FOUGEROLLES, ANTONIN;
DIENER, JOHN, L.;
HICKMAN, EMMA;
HINKLE, GREGORY;
MILSTEIN, STUART;
PULICHINO, ANNE-MARIE y
SPRAGUE, ANDREW**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 574 204 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

Composiciones orgánicas para tratar enfermedades relacionadas con beta-ENaC

- La superficie mucosa entre el entorno y el cuerpo tiene muchos mecanismos protectores. Una forma de defensa es limpiar la superficie con líquido. La cantidad de líquido refleja el equilibrio entre la secreción epitelial de líquidos (que a menudo refleja la secreción de aniones acoplada al agua y un contraión catiónico) y la absorción de líquidos (que a menudo refleja la absorción de Na^+ , acoplada a agua y a un contraanión). Muchas enfermedades de las superficies mucosas están ocasionadas por haber muy poco líquido, como la ocasionada por un desequilibrio entre la secreción (demasiado escasa) y la absorción (demasiado alta). Un método para equilibrar la capa de líquidos es la disminución de la absorción de líquidos mediada por el canal de Na^+ .
- 10 Los canales de sodio sensibles a la amilorida e independientes del voltaje controlan el transporte de líquidos y electrolitos a través del epitelio en muchos órganos. Las membranas apicales de muchos epitelios impermeables contienen canales de sodio que se caracterizan principalmente por su alta afinidad por la amilorida, un bloqueador diurético. Estos canales intervienen en la primera etapa de la reabsorción activa del sodio, esencial para el mantenimiento de las sales del cuerpo y la homeostasia del agua. En los vertebrados, los canales controlan la reabsorción del sodio en el riñón, colon, pulmón y glándulas sudoríparas; también intervienen en la percepción del sabor.

La etapa limitante de la velocidad de la absorción de Na^+ y de líquido está mediada por el canal epitelial de sodio (Na^+) (ENaC). Estos canales de sodio son complejos heteroméricos que consisten en 3 subunidades: α -ENaC, β -ENaC y γ -ENaC.

- 20 El β -ENaC (también conocido como SCNN1B) codifica la subunidad β de este canal de sodio y las mutaciones y/o alteraciones de la expresión de este gen se han asociado a diferentes enfermedades (y/o asociado a tratamientos de enfermedades), entre ellas fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1) síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasiemia e hipertensión asociada a la obesidad.

- 25 Caci et al. (2008) describieron una estrategia con siRNA para analizar la posibilidad de reducir la función del ENaC en los epitelios bronquiales y examinar los efectos resultantes sobre el transporte de líquidos. Las secuencias de siRNA complementarias a cada una de las tres subunidades del ENaC se utilizaron para establecer si la reducción de una sola subunidad sería suficiente para reducir la absorción de Na^+ .

- 30 La patente europea EP 1 752 536 describe composiciones farmacéuticas que comprenden siRNA, en donde la hebra sentido y antisentido tienen una discordancia dentro de un solapamiento de 15 nt con la hebra sentido y antisentido definida por la SEQ ID n.º 151 que viene a continuación.

Existe la necesidad de tratamientos relacionados con las enfermedades relacionadas con el β -ENaC.

Breve compendio de la invención

- Se describen agentes de RNAi del β -ENaC, que son útiles para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC, tales como la fibrosis quística, el pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), el síndrome de Liddle, la hipertensión, la alcalosis, la hipopotasiemia y la hipertensión asociada a la obesidad. También se describe un método para tratar un sujeto humano que tiene una enfermedad mediada al menos en parte por la expresión del α -ENaC, en donde el método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de RNAi del β -ENaC.

- 40 Se describen agentes de RNAi específicos y métodos que son útiles para reducir la cantidad de β -ENaC en un sujeto, p. ej., un mamífero, tal como un humano. Se describen específicamente agentes de RNAi bicatenario que comprenden al menos 15 o más nucleótidos contiguos del β -ENaC. En particular, se describen agentes que comprenden secuencias de 15 o más nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 de los de los agentes de RNAi dados a conocer, p. ej., en la tabla 1. Los agentes de RNAi pueden comprender en concreto menos de 30 nucleótidos por hebra, p. ej., tal como 18-23 nucleótidos, y/o 19-21 nucleótidos, y/o tales como los dados a conocer, p. ej., en la tabla 1.

- 45 Los agentes de RNAi bicatenario pueden tener extremos romos o protuberantes de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos (a saber, 1-4 nt) desde uno o ambos extremos 3' y/o 5'. Los agentes de RNAi bicatenario pueden también comprender facultativamente una o dos caperuzas en 3' y/o uno o varios nucleótidos modificados. Las variantes modificadas de las secuencias según se describen en la presente memoria incluyen las que son, por lo demás, idénticas, pero que contienen sustituciones de un nucleótido que aparece de forma natural para un correspondiente nucleótido modificado.

- 50 Además, el agente de RNAi puede contener o solo subunidades de ribonucleótidos que se producen en la naturaleza, o bien una o varias modificaciones del azúcar, fosfato o base de una o varias de las subunidades de los nucleótidos de reemplazo, tanto si comprenden subunidades de ribonucleótidos o subunidades de desoxirribonucleótidos. Las variantes modificadas de los agentes de RNAi descritas incluyen agentes de RNAi con la

misma secuencia, pero con una o varias modificaciones de uno o varios de azúcar, fosfato o base de una o varias de las subunidades de nucleótidos. Las modificaciones mejoran la eficacia, la estabilidad y/o reducen la inmunogenia del agente de RNAi. Se describe un oligonucleótido bicatenario que comprende al menos una nucleobase no natural. La nucleobase no natural puede ser difluorotolilo, nitroindolilo, nitropirrolilo o nitroimidazolilo. Solo una de las dos hebras oligonucleotídicas puede contener una nucleobase no natural, o ambas hebras oligonucleotídicas pueden contener una nucleobase no natural.

El agente o agentes de RNAi pueden facultativamente estar unidos a un ligando seleccionado por mejorar una o varias características, tal como, p. ej., estabilidad, distribución y/o captación celular del agente, p. ej., colesterol o un derivado del mismo. El agente o agentes de RNAi se pueden aislar o ser parte de una composición farmacéutica utilizada para los métodos descritos. En concreto, la composición farmacéutica se puede formular para la administración en los pulmones o para el pase nasal, o formularse para la administración parental. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender facultativamente dos o más agentes de RNAi, cada uno dirigido al mismo o diferente segmento del ARNm del β -ENaC. Facultativamente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además cualquier tratamiento conocido contra cualquier enfermedad relacionada con el β -ENaC, o pueden utilizarse junto con ellos.

Los métodos se describen porque reducen el nivel del ARNm del β -ENaC en una célula, en concreto en el caso de una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión o la hiperactividad del ENaC. También se describe un método de tratamiento de un sujeto humano que tiene una enfermedad mediada al menos en parte por la expresión del β -ENaC, en donde el método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de RNAi del β -ENaC. Tales métodos comprenden la etapa de administrar uno de los agentes de RNAi descritos, tal y como se describe adicionalmente a continuación. Los métodos descritos utilizan los mecanismos celulares implicados en la interferencia por ARN (RNAi) para degradar selectivamente el ARN diana en una célula y comprenden la etapa de poner en contacto una célula con uno de los agentes de RNAi descritos. Tales métodos se pueden realizar directamente en una célula o se pueden realizar en un sujeto mamífero mediante la administración a un sujeto de uno de los agentes de RNAi o las composiciones farmacéuticas descritas. La reducción del ARNm del β -ENaC diana en una célula da lugar a la reducción de la cantidad de la proteína β -ENaC codificada que se produce. En un organismo, esto puede dar lugar a la reducción de la diferencia de potencial epitelial, al equilibrio de la absorción de líquidos, y al incremento de la eliminación mucociliar.

Los métodos y las composiciones descritos, p. ej., los métodos y las composiciones del agente de RNAi del β -ENaC, se pueden utilizar a cualquier dosis y/o en cualquier formulación descrita en la presente memoria, así como por cualquier vía de administración descrita en la presente memoria.

Los detalles de una o varias realizaciones de la presente descripción se presentan en los dibujos acompañantes y la descripción que viene a continuación.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1B describen la capacidad que tiene los agentes de RNAi AD20807, AD20826, AD20832, AS20834, AD20848 y AD20861 para atenuar la actividad del β -ENaC *in vivo*.

Las figuras 2A-2C describen el efecto *in vitro* del agente de RNAi del β -ENaC AD20832 sobre la actividad funcional del canal ENaC en las células epiteliales bronquiales humanas.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción abarca agentes de RNAi del β -ENaC, que son útiles para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC (p. ej., enfermedades asociadas a mutaciones y/o alteración de la expresión, el nivel y/o la actividad del β -ENaC, y/o enfermedades tratables mediante la modulación de la expresión, el nivel y/o la actividad del β -ENaC), tales como la fibrosis quística, el pseudohipopaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), el síndrome de Liddle, la hipertensión, la alcalosis, la hipopotasiemia y la hipertensión asociada a la obesidad.

Diferentes realizaciones de la presente descripción incluyen: un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido tal y como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la cadena antisentido de un agente de RNAi específico del β -ENaC (o cualquier conjunto de agentes de RNAi solapantes específicos del β -ENaC) descrito, por ejemplo, en la tabla 1. Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi de cualquier secuencia descrita en la presente memoria. Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la primera hebra, y la segunda hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia de la segunda hebra de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria.

Dobles hebras concretas incluyen las siguientes, en donde cada doble hebra comprende un conjunto de números de SEQ ID, en donde el primer número de SEQ ID corresponde a la primera hebra (p. ej., una cadena sentido) y el segundo número de SEQ ID corresponde a una segunda hebra (p. ej., una hebra antisentido: AD-20805 (SEQ ID n.^{os} 111 y 112); AD-20806 (SEQ ID n.^{os} 113 y 114); AD-20807 (SEQ ID n.^{os} 115 y 116); AD-20808 (SEQ ID n.^{os} 117 y 118); AD-20809 (SEQ ID n.^{os} 119 y 120); AD-20810 (SEQ ID n.^{os} 121 y 122); AD-20811 (SEQ ID n.^{os} 123 y 124); AD-20812 (SEQ ID n.^{os} 125 y 126); AD-20813 (SEQ ID n.^{os} 127 y 128); AD-20814 (SEQ ID n.^{os} 129 y 130); AD-20815 (SEQ ID n.^{os} 131 y 132); AD-20816 (SEQ ID n.^{os} 133 y 134); AD-20817 (SEQ ID n.^{os} 135 y 136); AD-20818 (SEQ ID n.^{os} 137 y 138); AD-20819 (SEQ ID n.^{os} 139 y 140); AD-20820 (SEQ ID n.^{os} 141 y 142); AD-20821 (SEQ ID n.^{os} 143 y 144); AD-20822 (SEQ ID n.^{os} 145 y 146); AD-20823 (SEQ ID n.^{os} 147 y 148); AD-20824 (SEQ ID n.^{os} 149 y 150); AD-20825 (SEQ ID n.^{os} 151 y 152); AD-20826 (SEQ ID n.^{os} 153 y 154); AD-20827 (SEQ ID n.^{os} 155 y 156); AD-20828 (SEQ ID n.^{os} 157 y 158); AD-20829 (SEQ ID n.^{os} 159 y 160); AD-20830 (SEQ ID n.^{os} 161 y 162); AD-20831 (SEQ ID n.^{os} 163 y 164); AD-20832 (SEQ ID n.^{os} 165 y 166); AD-20833 (SEQ ID n.^{os} 167 y 168); AD-20834 (SEQ ID n.^{os} 169 y 170); AD-20835 (SEQ ID n.^{os} 171 y 172); AD-20836 (SEQ ID n.^{os} 173 y 174); AD-20837 (SEQ ID n.^{os} 175 y 176); AD-20838 (SEQ ID n.^{os} 177 y 178); AD-20839 (SEQ ID n.^{os} 179 y 180); AD-20840 (SEQ ID n.^{os} 181 y 182); AD-20841 (SEQ ID n.^{os} 183 y 184); AD-20842 (SEQ ID n.^{os} 185 y 186); AD-20843 (SEQ ID n.^{os} 187 y 188); AD-20844 (SEQ ID n.^{os} 189 y 190); AD-20845 (SEQ ID n.^{os} 191 y 192); AD-20846 (SEQ ID n.^{os} 193 y 194); AD-20847 (SEQ ID n.^{os} 195 y 196); AD-20848 (SEQ ID n.^{os} 197 y 198); AD-20849 (SEQ ID n.^{os} 199 y 200); AD-20850 (SEQ ID n.^{os} 201 y 202); AD-20851 (SEQ ID n.^{os} 203 y 204); AD-20852 (SEQ ID n.^{os} 205 y 206); AD-20861 (SEQ ID n.^{os} 207 y 208); AD-20862 (SEQ ID n.^{os} 209 y 210); AD-20863 (SEQ ID n.^{os} 211 y 212); AD-20864 (SEQ ID n.^{os} 213 y 214); AD-20865 (SEQ ID n.^{os} 215 y 216); AD-20866 (SEQ ID n.^{os} 217 y 218) y AD-20867 (SEQ ID n.^{os} 219 y 220), y variantes modificadas de los mismos.

Se describen variantes modificadas de dobles hebras concretas, en donde cada doble hebra comprende un conjunto de números de SEQ ID, en donde el primer número de SEQ ID corresponde a una primera hebra (p. ej., una hebra sentido) y el segundo número de SEQ ID corresponde a una segunda hebra (p. ej., una hebra antisentido) que se seleccionan del grupo que consiste en AD-20805 (SEQ ID n.^{os} 1 y 2); AD-20806 (SEQ ID n.^{os} 3 y 4); AD-20807 (SEQ ID n.^{os} 5 y 6); AD-20808 (SEQ ID n.^{os} 7 y 8); AD-20809 (SEQ ID n.^{os} 9 y 10); AD-20810 (SEQ ID n.^{os} 11 y 12); AD-20811 (SEQ ID n.^{os} 13 y 14); AD-20812 (SEQ ID n.^{os} 15 y 16); AD-20813 (SEQ ID n.^{os} 17 y 18); AD-20814 (SEQ ID n.^{os} 19 y 20); AD-20815 (SEQ ID n.^{os} 21 y 22); AD-20816 (SEQ ID n.^{os} 23 y 24); AD-20817 (SEQ ID n.^{os} 25 y 26); AD-20818 (SEQ ID n.^{os} 27 y 28); AD-20819 (SEQ ID n.^{os} 29 y 30); AD-20820 (SEQ ID n.^{os} 31 y 32); AD-20821 (SEQ ID n.^{os} 33 y 34); AD-20822 (SEQ ID n.^{os} 35 y 36); AD-20823 (SEQ ID n.^{os} 37 y 38); AD-20824 (SEQ ID n.^{os} 39 y 40); AD-20825 (SEQ ID n.^{os} 41 y 42); AD-20826 (SEQ ID n.^{os} 43 y 44); AD-20827 (SEQ ID n.^{os} 45 y 46); AD-20828 (SEQ ID n.^{os} 47 y 48); AD-20829 (SEQ ID n.^{os} 49 y 50); AD-20830 (SEQ ID n.^{os} 51 y 52); AD-20831 (SEQ ID n.^{os} 53 y 54); AD-20832 (SEQ ID n.^{os} 55 y 56); AD-20833 (SEQ ID n.^{os} 57 y 58); AD-20834 (SEQ ID n.^{os} 59 y 60); AD-20835 (SEQ ID n.^{os} 61 y 62); AD-20836 (SEQ ID n.^{os} 63 y 64); AD-20837 (SEQ ID n.^{os} 65 y 66); AD-20838 (SEQ ID n.^{os} 67 y 68); AD-20839 (SEQ ID n.^{os} 69 y 70); AD-20840 (SEQ ID n.^{os} 71 y 72); AD-20841 (SEQ ID n.^{os} 73 y 74); AD-20842 (SEQ ID n.^{os} 75 y 76); AD-20843 (SEQ ID n.^{os} 77 y 78); AD-20844 (SEQ ID n.^{os} 79 y 80); AD-20845 (SEQ ID n.^{os} 81 y 82); AD-20846 (SEQ ID n.^{os} 83 y 84); AD-20847 (SEQ ID n.^{os} 85 y 86); AD-20848 (SEQ ID n.^{os} 87 y 88); AD-20849 (SEQ ID n.^{os} 89 y 90); AD-20850 (SEQ ID n.^{os} 91 y 92); AD-20851 (SEQ ID n.^{os} 93 y 94); AD-20852 (SEQ ID n.^{os} 95 y 96); AD-20861 (SEQ ID n.^{os} 97 y 98); AD-20862 (SEQ ID n.^{os} 99 y 100); AD-20863 (SEQ ID n.^{os} 101 y 102); AD-20864 (SEQ ID n.^{os} 103 y 104); AD-20865 (SEQ ID n.^{os} 105 y 106); AD-20866 (SEQ ID n.^{os} 107 y 108) y AD-20867 (SEQ ID n.^{os} 109 y 110).

Composiciones concretas

Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β -ENaC seleccionado de cualquier secuencia (o conjunto solapante de secuencias) descrito en una tabla de la presente memoria (p. ej., la tabla 1). Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β -ENaC seleccionado de cualquier secuencia (o conjunto solapante de secuencias) descrito en una tabla de la presente memoria (p. ej., la tabla 1). Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi de cualquier secuencia descrita en la presente memoria. Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de secuencia de la primera hebra, y la segunda hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia de la segunda hebra, de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria. Dobles hebras concretas incluyen las dobles hebras específicas que se dan a conocer más arriba y según se recoge en una cualquiera o varias de la tabla 1. También se contemplan otras secuencias modificadas (p. ej., secuencias que comprenden una o varias bases modificadas) de cada una de las composiciones de más arriba.

La tabla A1 que viene a continuación da a conocer los números de SEQ ID de las secuencias sin modificar y modificadas de ejemplo de las hebras sentido y antisentido de diferentes agentes de RNAi del β -ENaC. La composición de las bases de cada secuencia específica representada por el número de SEQ ID se da a conocer en

ES 2 574 204 T3

más detalle en la tabla 1, y partes de las mismas se dan a conocer en la tabla 2.

Tabla A1. Números de SEQ ID de una primera y una segunda hebras (p. ej., cadenas sentido («SS») y antisentido («AS») para agentes de RNAi del β -ENaC.

Agente de RNAi: nombre de la doble hebra		SEQ ID n.º de la secuencia modificada	SEQ ID n.º de la secuencia sin modificar
AD-20805	Sentido	1	111
	Antisentido	2	112
AD-20806	Sentido	3	113
	Antisentido	4	114
AD-20807	Sentido	5	115
	Antisentido	6	116
AD-20808	Sentido	7	117
	Antisentido	8	118
AD-20809	Sentido	9	119
	Antisentido	10	120
AD-20810	Sentido	11	121
	Antisentido	12	122
AD-20811	Sentido	13	123
	Antisentido	14	124
AD-20812	Sentido	15	125
	Antisentido	16	126
AD-20813	Sentido	17	127
	Antisentido	18	128
AD-20814	Sentido	19	129
	Antisentido	20	130
AD-20815	Sentido	21	131
	Antisentido	22	132
AD-20816	Sentido	23	133
	Antisentido	24	134
AD-20817	Sentido	25	135
	Antisentido	26	136
AD-20818	Sentido	27	137
	Antisentido	28	138
AD-20819	Sentido	29	139
	Antisentido	30	140
AD-20820	Sentido	31	141
	Antisentido	32	142
AD-20821	Sentido	33	143
	Antisentido	34	144
AD-20822	Sentido	35	145
	Antisentido	36	146
AD-20823	Sentido	37	147

ES 2 574 204 T3

	Antisentido	38	148
AD-20824	Sentido	39	149
	Antisentido	40	150
AD-20825	Sentido	41	151
	Antisentido	42	152
AD-20826	Sentido	43	153
	Antisentido	44	154
AD-20827	Sentido	45	155
	Antisentido	46	156
AD-20828	Sentido	47	157
	Antisentido	48	158
AD-20829	Sentido	49	159
	Antisentido	50	160
AD-20830	Sentido	51	161
	Antisentido	52	162
AD-20831	Sentido	53	163
	Antisentido	54	164
AD-20832	Sentido	55	165
	Antisentido	56	166
AD-20833	Sentido	57	167
	Antisentido	58	168
AD-20834	Sentido	59	169
	Antisentido	60	170
AD-20835	Sentido	61	171
	Antisentido	62	172
AD-20836	Sentido	63	173
	Antisentido	64	174
AD-20837	Sentido	65	175
	Antisentido	66	176
AD-20838	Sentido	67	177
	Antisentido	68	178
AD-20839	Sentido	69	179
	Antisentido	70	180
AD-20840	Sentido	71	181
	Antisentido	72	182
AD-20841	Sentido	73	183
	Antisentido	74	184
AD-20842	Sentido	75	185
	Antisentido	76	186
AD-20843	Sentido	77	187
	Antisentido	78	188
AD-20844	Sentido	79	189

	Antisentido	80	190
AD-20845	Sentido	81	191
	Antisentido	82	192
AD-20846	Sentido	83	193
	Antisentido	84	194
AD-20847	Sentido	85	195
	Antisentido	86	196
AD-20848	Sentido	87	197
	Antisentido	88	198
AD-20849	Sentido	89	199
	Antisentido	90	200
AD-20850	Sentido	91	201
	Antisentido	92	202
AD-20851	Sentido	93	203
	Antisentido	94	204
AD-20852	Sentido	95	205
	Antisentido	96	206
AD-20861	Sentido	97	207
	Antisentido	98	208
AD-20862	Sentido	99	209
	Antisentido	100	210
AD-20863	Sentido	101	211
	Antisentido	102	212
AD-20864	Sentido	103	213
	Antisentido	104	214
AD-20865	Sentido	105	215
	Antisentido	106	216
AD-20866	Sentido	107	217
	Antisentido	108	218
AD-20867	Sentido	109	219
	Antisentido	110	220

Por ejemplo, en la tabla A1, la SEQ ID n.º 1 (la hebra sentido) y la SEQ ID n.º 2 (la hebra antisentido) representan una secuencia modificada de ejemplo del agente de RNAi AD-20805. La secuencia sin modificar del AD-20805 está representada por la SEQ ID n.º 111 (la hebra sentido) y la SEQ ID n.º 112 (la hebra antisentido). Así pues, la tabla A1 presenta los números de identificación de SEQ ID de una primera y una segunda hebra de la secuencia sin modificar y al menos una secuencia modificada de ejemplo de cada uno de los diferentes agentes de RNAi del β -ENaC.

Un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido descrita en la presente memoria

Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β -ENaC seleccionado de las hebras antisentido de las dobles hebras específicas dadas a conocer en la presente memoria y que se recogen, por ejemplo, en la tabla 1.

En una realización, la composición comprende además un segundo agente de RNAi del β -ENaC. En diversas realizaciones, el segundo agente de RNAi está físicamente separado del primero, o los dos están en conexión física

(p. ej., unidos covalentemente o, si no, conjugados).

En una realización, la hebra antisentido tiene unos 30 nt o menos de longitud.

En una realización, la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región bicatenaria con una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 parejas de nucleótidos.

- 5 En una realización, la hebra antisentido tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 36 nt de longitud, que incluye de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nt de longitud, y además incluye de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nt de longitud. En una realización, la cadena antisentido tiene al menos la longitud seleccionada de aproximadamente 15 nt, aproximadamente 16 nt, aproximadamente 17 nt, aproximadamente 18 nt, aproximadamente 19 nt, aproximadamente 20 nt, aproximadamente 21 nt, aproximadamente 22 nt, aproximadamente 23 nt, aproximadamente 24 nt, aproximadamente 25 nt, aproximadamente 26 nt, aproximadamente 27 nt, aproximadamente 28 nt, aproximadamente 29 nt y aproximadamente 30 nt.

En una realización, el agente de RNAi comprende una modificación que ocasiona que el agente de RNAi tenga aumentada la estabilidad en una muestra biológica o entorno, p. ej., suero sanguíneo o líquido de lavado intestinal.

- 15 En una realización, el agente de RNAi comprende al menos una modificación en la cadena de azúcar (p. ej., unión a fosforotioato) y/o al menos un nucleótido con el 2' modificado. En una realización, todas las pirimidinas son nucleótidos modificados por 2'-O-metilación.

- 20 En una realización, el agente de RNAi comprende: al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con el 2' modificado.

- 25 En una realización, el agente de RNAi comprende una modificación en 2' seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA). En una realización, todas las pirimidinas son nucleótidos modificados con 2'-O-metilo.

En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo romo.

En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo protuberante que tiene de 1 a 4 nucleótidos desapareados.

- 30 En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo protuberante en el extremo 3' de la hebra antisentido del agente de RNAi.

- 35 En una realización, el agente de RNAi está ligado a uno o varios compuestos de diagnóstico, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, resto que confiere resistencia a nucleasas, nucleobase natural o inusual, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol, vitamina, glúcido, dextrano, pululano, quitina, quitosano, glúcido sintético, oligolactato de 15 restos, polímero natural, polímero de masa molecular baja o media, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de fijación a proteínas, molécula que actúa selectivamente sobre la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitador peptídico y/o transferrina.

En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 60% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

- 40 En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 70% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 80% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

- 45 En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 90% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

En una realización, el RNAi tiene una CE_{50} de no más de aproximadamente 0,1 nM.

En una realización, el RNAi tiene una CE_{50} de no más de aproximadamente 0,01 nM.

En una realización, el RNAi tiene una CE_{50} de no más de aproximadamente 0,001 nM.

Un agente de RNAi que comprende una primera y segunda hebras descritas en la presente memoria

- 50 Se describe una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una primera hebra y una segunda

hebra, en donde la primera hebra y la segunda hebra comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos, en donde cada una difiere en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la primera y segunda hebras, respectivamente, de un agente de RNAi específico del β -ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y recogidas, p. ej., en la tabla 1.

- 5 En una realización, la composición comprende además un segundo agente de RNAi específico del β -ENaC. En diferentes realizaciones, el segundo agente de RNAi está físicamente separado del primero, o los dos están físicamente conectados (p. ej., covalentemente unidos o, si no, conjugados).

En una realización, la hebra antisentido tiene 30 nt de longitud, o menos.

- 10 En una realización, la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 pares de bases de longitud.

- 15 En una realización, la hebra antisentido tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 36 nt de longitud, que incluye de aproximadamente 18 a aproximadamente 23 nt de longitud, y que incluye de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nt de longitud. En una realización, la hebra antisentido tiene al menos la longitud seleccionada de aproximadamente 15 nt, aproximadamente 16 nt, aproximadamente 17 nt, aproximadamente 18 nt, aproximadamente 19 nt, aproximadamente 20 nt, aproximadamente 21 nt, aproximadamente 22 nt, aproximadamente 23 nt, aproximadamente 24 nt, aproximadamente 25 nt, aproximadamente 26 nt, aproximadamente 27 nt, aproximadamente 28 nt, aproximadamente 29 nt y aproximadamente 30 nt.

- 20 En una realización, el agente de RNAi comprende una modificación que hace que el agente de RNAi tenga un incremento de la estabilidad en una muestra biológica o entorno, p. ej., suero sanguíneo o líquido del lavado intestinal.

En una realización, el agente de RNAi comprende al menos una modificación del esqueleto de azúcar (p. ej., unión de fosforotioato) y/o al menos un nucleótido con el 2' modificado. En una realización, todas las pirimidinas son nucleótidos modificados por 2'-O-metilación.

- 25 En una realización, el agente de RNAi comprende: al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido con el 2' modificado; y/o al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con el 2' modificado.

- 30 En una realización, el agente de RNAi comprende una modificación en 2' seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).

En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo romo.

- 35 En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo protuberante que tiene de 1 a 4 nucleótidos desapareados.

En una realización, el agente de RNAi comprende un extremo protuberante en el extremo 3' de la hebra antisentido del agente de RNAi.

- 40 En una realización, el agente de RNAi está ligado a uno o varios compuestos de diagnóstico, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, resto que confiere resistencia a nucleasas, nucleobase natural o inusual, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol, vitamina, glúcido, dextrano, pululano, quitina, quitosano, glúcido sintético, oligolactato de 15 restos, polímero natural, polímero de masa molecular baja o media, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de fijación a proteínas, molécula que actúa selectivamente sobre la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitador peptídico y/o transferrina.

- 45 En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 60% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 70% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

- 50 En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 80% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

En una realización, el agente de RNAi es capaz de inhibir la expresión del gen del β -ENaC al menos aproximadamente el 90% a una concentración de 10 nM en las células H441 *in vitro*.

En una realización, el RNAi tiene una CE₅₀ de no más de aproximadamente el 0,1 nM.

En una realización, el RNAi tiene una CE₅₀ de no más de aproximadamente el 0,01 nM.

En una realización, el RNAi tiene una CE₅₀ de no más de aproximadamente el 0,001 nM.

Un método de tratamiento que hace uso de un agente de RNAi descrito en la presente memoria

- 5 Se describe un método para tratar una enfermedad relacionada con el β-ENaC en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente de RNAi que comprende al menos una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2, o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β-ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y según se recoge, p. ej., en la tabla 1. Se describe tal método, en donde la composición que comprende un agente de RNAi que comprende además una hebra sentido, en donde la hebra sentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra sentido de un agente de RNAi del β-ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y según se recoge, p. ej., en la tabla 1.

- 10 En una realización, la enfermedad relacionada con el β-ENaC es fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasiemia y/o hipertensión asociada a la obesidad.

En una realización, la enfermedad relacionada con el β-ENaC es la fibrosis quística.

Se describe un método que comprende además la administración de un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición.

Se describe que el tratamiento adicional es un método (o procedimiento).

- 20 Se describe que el tratamiento adicional y el agente de RNAi se pueden administrar en cualquier orden o se pueden administrar simultáneamente.

Se describe que el método comprende además la etapa de administrar un tratamiento adicional para la fibrosis quística, para el pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), para el síndrome de Liddle, para la hipertensión, para la alcalosis, para la hipopotasiemia y/o para la hipertensión asociada a la obesidad.

- 25 Se describe que el método comprende además la etapa de administrar un tratamiento o terapia adicional seleccionado de la lista de antagonista adicional del ENaC, diurético ahorrador de potasio, amilorida, triamtereno, regulación de la ingesta de sal por la dieta, antibióticos, terapia con ADNasa, albutrol, *N*-acetilcisteína, terapia respiratoria, terapia percutánea y ejercicio aeróbico.

- 30 Se describe que la composición comprende un segundo agente de RNAi del β-ENaC. En diferentes realizaciones, el segundo agente de RNAi está físicamente separado del primero o los dos están físicamente conectados (p. ej., unidos covalentemente o, si no, conjugados).

- 35 Se describe que el método comprende además la etapa de administrar un agente de RNAi adicional que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β-ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y según se recoge, p. ej., en la tabla 1.

Un método para inhibir la expresión del β-ENaC, mediante el uso de un agente de RNAi descrito en la presente memoria

- 40 Se describe un método para inhibir la expresión del gen del β-ENaC en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente de RNAi de la presente descripción. El agente de RNAi puede comprender al menos una hebra antisentido y/o comprende una hebra sentido y antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi del β-ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y según se recoge, p. ej., en la tabla 1.

- 45 A continuación se describen diferentes realizaciones de este aspecto de la invención.

Se describe que el individuo padece o es propenso a padecer una enfermedad relacionada con el β-ENaC.

Se describe que la enfermedad relacionada con el β-ENaC es fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasiemia y/o hipertensión asociada a la obesidad.

Se describe que la enfermedad relacionada con el β-ENaC es la fibrosis quística.

- 50 Se describe que el método comprende además la administración de un tratamiento adicional. El tratamiento

adicional puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición.

Se describe que el tratamiento adicional es un método (o procedimiento).

Se describe que el tratamiento adicional y el agente de RNAi se pueden administrar en cualquier orden o que se pueden administrar a la vez.

- 5 Se describe que el método comprende además la etapa de administrar un tratamiento adicional para la fibrosis quística, el pseudohipopaldosteronismo de tipo 1 (PHA), el síndrome de Liddle, la hipertensión, la alcalosis, la hipopotasemia y/o la hipertensión asociada a la obesidad.

- 10 Se describe que el método comprende además la etapa de administrar un tratamiento o terapia adicional seleccionado de la lista de, adicionalmente, un antagonista del ENaC, diurético ahorrador de potasio, amilorida, triamtereno, regulación de la ingesta de sal por la dieta, antibióticos, terapia con ADNasa, albutrol, *N*-acetilcisteína, terapia respiratoria, terapia percutánea y ejercicio aeróbico.

Se describe que la composición comprende un segundo agente de RNAi específico del β -ENaC. Se describe que el segundo agente de RNAi puede estar físicamente separado del primero o los dos estar físicamente conectados (p. ej., unidos covalentemente o, si no, conjugados).

- 15 Se describe que el método puede comprender además la etapa de administrar un agente de RNAi adicional que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la hebra antisentido de un agente de RNAi específico del β -ENaC seleccionado de las dobles hebras específicas descritas en la presente memoria y según se recoge, p. ej., en la tabla 1.

Formulaciones farmacéuticas de un agente de RNAi específico del β -ENaC

- 20 En una realización específica concreta, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un agente de RNAi según se define en las reivindicaciones adjuntas. El agente de RNAi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de un agente de RNAi específico del β -ENaC, en donde la composición está en una formulación farmacéuticamente eficaz.
- 25 En una realización, la presente descripción pertenece al uso de un agente de RNAi para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el β -ENaC, en donde el agente de RNAi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de un agente de RNAi específico del β -ENaC de una doble hebra específica dada a conocer en la presente memoria.

30 ENaC

Con «ENaC» se hace referencia al canal epitelial de sodio, una proteína de la membrana formada por tres subunidades diferentes pero homólogas (α , β y γ).

- 35 El ENaC está presente en la membrana apical de las células epiteliales de la nefrona distal (túbulo colector medular y cortical) y el colon distal, y en las vías aéreas y en los conductos excretores de varias glándulas. El ENaC también se expresa en la placenta, en el cerebro y en la vejiga urinaria. Proporciona una vía de entrada controlada para el Na^+ desde la luz de estos órganos hacia las células epiteliales y, junto con la Na^+/K^+ -ATPasa localizada en la membrana basolateral de las mismas células, es responsable del transporte vectorial activo de Na^+ desde el medio externo a través de las células epiteliales hasta el líquido extracelular y hacia la sangre. El ENaC está localizado en la membrana apical de cara a la luz y permite el movimiento del sodio desde la luz hasta la célula epitelial. A
- 40 continuación, el sodio reabsorbido a través del ENaC se extrae de la célula epitelial y se devuelve al torrente circulatorio mediante la Na^+/K^+ -ATPasa. La reabsorción del sodio realizada por el ENaC está acompañada por una captación osmótica de agua para mantener constante la concentración extracelular de Na^+ . Esto cambia la volemia y, en consecuencia, afecta a la tensión arterial. Así pues, el ENaC desempeña una función importante en la homeostasia de los electrolitos y en el control de la volemia y de la tensión arterial. Véase, p. ej., Saxena et al., 1998,
- 45 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252: 208-213.

- El ENaC tiene diferentes funciones en los distintos órganos en los que se expresa. En el riñón (túbulo colector), la reabsorción modulada del Na^+ a través del ENaC proporciona el mecanismo principal de la regulación de la excreción urinaria de Na^+ y, por lo tanto, permite el control delicado del equilibrio de Na^+ en todo el organismo bajo el control hormonal de la aldosterona. Mediante su efecto despolarizador del potencial de la membrana apical, el canal
- 50 de Na^+ también proporciona la fuerza conductora para la secreción tubular de K^+ .

Los inhibidores específicos del ENaC favorecen la excreción del Na^+ por la orina e inhiben la secreción del K^+ ; estos fármacos (entre ellos la amilorida y el triamtereno) se utilizan, por tanto, como diuréticos ahorradores del K^+ . El ENaC tiene una función similar en el colon distal, lo que impide una pérdida excesiva de Na^+ por las heces. En las vías aéreas, una función importante es la reabsorción del líquido que llena las vías aéreas con el parto, al favorecer

el cambio desde la secreción de líquido (antes del parto) a la reabsorción de líquido (posnatal).

Con el regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística, también participa en la regulación delicada del equilibrio de líquidos en las vías aéreas, mediante el que se mantiene una delgada película de líquido en la mucosa necesaria para la eliminación de la mucosidad. En los conductos excretores de las glándulas salivales y sudoríparas, la actividad del ENaC tiende a disminuir la concentración luminal del Na⁺, lo que permite la excreción de una saliva menos salada e impide una mayor pérdida de Na⁺ por el líquido del sudor. Véase, por ejemplo, Hummler et al. 1999 *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: 567-571 y las referencias citadas en ésta.

Las alteraciones y las mutaciones de la secuencia y/o de la expresión del ENaC pueden conducir a la sobreexpresión o hiperactividad del ENaC. Los agentes de RNAi dados a conocer en esta descripción restauran el equilibrio para la reabsorción modulada de Na⁺ mediante la reducción de la cantidad del β-ENaC.

β-ENaC

Con «β-ENaC» se quiere hacer referencia al gen o proteína de la subunidad β del canal de sodio sensible a la amilorida (o cualquier ácido nucleico que codifique esta proteína), que también se denomina de otras formas: canal de sodio 1 independiente del voltaje, β; SCNN1B; bENaC; ENaCb; ENaC-β; SCNEB o β-ENaC. Otros identificadores incluyen: OMIM: 600760; MGI: 104696; HomoloGene: 284; y GeneCards: SCNN1B. Se puede encontrar más información en: Humano: Entrez 6338; Ensembl ENSG00000168447; UniProt P51168; RefSeq (mRNA) NM_000336, RefSeq (proteína) NP_000327; Localización (UCSC) Chr 16: 23,22-23,3 Mb. Ratón: Entrez 20277; Ensembl ENSMUSG0000030873; UniProt Q3TP51; RefSeq (mRNA) NM_011325; RefSeq (proteína) NP_035455; Localización (UCSC) Chr 7: 121,66-121,71 Mb.

La secuencia aminoacídica del β-ENaC humano se da a conocer en Saxena et al., 1998 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252: 208-213.

Se han delineado los dominios funcionales del β-ENaC. La proteína tiene un dominio intracelular aminoterminal [aminoácidos («aa») 1 a 50], un primer dominio transmembranario (aa 51 a 71), un bucle extracelular (aa 72 a 533), un segundo dominio transmembranario (aa 534 a 553) y un dominio intracelular carboxiterminal (aa 554 a 640).

El dominio intracelular carboxiterminal contiene dos regiones en las que las mutaciones están relacionadas con el síndrome de Liddle y otras enfermedades: en la región desde el aminoácido 564 al 595 y el motivo «PY» [con la secuencia aminoacídica de consenso PPXY en los aa (aminoácidos) 615 a 618]. Véase, p. ej., Saxena et al. 1998.

El agente de RNAi del β-ENaC de la presente descripción puede interactuar con una porción del ARNm correspondiente a un dominio o dominios funcionales específicos del β-ENaC. En diferentes realizaciones, los agentes de RNAi de la presente memoria se fijan específicamente al ARNm del β-ENaC, en una secuencia que corresponde a un dominio funcional, p. ej., en el dominio intracelular aminoterminal, en el primer dominio transmembranario, en el bucle extracelular, en el segundo dominio transmembranario, o en el dominio intracelular carboxiterminal o, más específicamente, en la región del aminoácido 564 al 595, o en el motivo PY (aminoácidos 615 a 618).

Se describen agentes de RNAi que se fijan a la UTR (a saber, región o regiones sin traducir) en 5' o en 3'.

Se describen agentes de RNAi que se fijan al ARNm del β-ENaC, pero no en una secuencia que corresponde a un dominio funcional concreto, p. ej., no en el dominio intracelular aminoterminal, no en el primer dominio transmembranario, no en el bucle extracelular, no en el segundo dominio transmembranario, o no en el dominio intracelular carboxiterminal o, más específicamente, no en la región del aminoácido 564 al 595, o no en el motivo PY (aminoácidos 615 a 618).

Tal y como está descrito, la fijación de un agente de RNAi a una región concreta del ARNm del β-ENaC conduce a la reducción de la expresión, nivel y/o actividad del β-ENaC.

La eficacia de un agente de RNAi a la hora de reducir el nivel del β-ENaC se puede medir directamente, p. ej., midiendo la abundancia (nivel) del ARNm del β-ENaC o la cantidad de la propia proteína. Como alternativa, la eficacia del RNAi se puede medir indirectamente midiendo el nivel de una cualquiera o varias de las actividades conocidas del β-ENaC, o midiendo los cambios de la actividad de los componentes de la vía que entran en acción después del β-ENaC.

La principal actividad de la proteína es formar, junto con el α-ENaC y el γ-ENaC y, posiblemente a veces, el δ-ENaC, el canal de sodio ENaC. β-ENaC, γ-ENaC y δ-ENaC pueden también formar un tipo concreto de canal encontrado en el páncreas, testículos y ovarios. También se ha demostrado que el β-ENaC interacciona con WWP2 y NEDD4. Véase, p. ej., McDonald et al., (2002). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283 (3): F431-6; Harvey et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276 (11): 8597-601; Farr et al. (2000). *Biochem. J.* 345 Pt 3: 503-9. La actividad del β-ENaC se puede medir, por ejemplo, por su capacidad para fijarse y formar unidades funcionales con estos otros componentes biológicos. La eficacia de un agente de RNAi también se puede medir indirectamente midiendo la cantidad de líquido de la superficie de las membranas mucosas y a través de estudios histológicos de los tejidos que expresan el β-ENaC.

Secuencias de β -ENaC en diferentes especies

Un agente de RNAi específico del β -ENaC se puede diseñar de tal manera que la secuencia del mismo coincida completamente con la del ARNm que corresponde al gen del β -ENaC de humano y el gen homólogo de un animal problema. Así pues, se puede utilizar exactamente el mismo agente de RNAi en ambos, el animal problema (p. ej., rata, ratón, macaco cangrejero, etc.) y los humanos. Las secuencias para los diferentes genes de ENaC se han determinado en muchas especies, entre ellos humano, ratón, rata, bovino y pollo, tal y como se describe, entre otros, en Garty et al, 1997 *Physiol. Rev.* 77: 359-396; y Ahn et al. 1999 *Am. J. Physiol.* 277: F121-F129.

Se ha determinado la secuencia del β -ENaC del macaco cangrejero (*Macaca fascicularis* o «cyno»).

El alineamiento de las secuencias del ARNm del β -ENaC de cyno (SEQ ID n.º 221) y del ARNm del β -ENaC de humano (SEQ ID n.º 222) se muestra a continuación.

Cyno Beta-ENaC	-----	
Human Beta-ENaC	GTGCTTCCCCGCCCTGAACCTGCTCCCTCCAGTCGGTCTCGCCGCGCT	50
Cyno Beta-ENaC	-----GGTACCCAGCTTGCT	15
Human Beta-ENaC	CGCCGGGTGTCCAGTGTACCAACACTCGGCCGCCGCCAGCTTGGC	100
	* *****	
Cyno Beta-ENaC	TGTTCTTTTTCGAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAAT	65
Human Beta-ENaC	GCGCACCGCCGCTCCGCCACCGCCGACAGCGCGCATCCTCCGTGTCCCC	150
	** ** * * *	
Cyno Beta-ENaC	TCCCGGGGATCCGA-ATTCGCCACCATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTG	114
Human Beta-ENaC	GCTCCGCCGCCGAGCAGGTGCCACTATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTG	200
	* *** * * * *****	
Cyno Beta-ENaC	AAGTGCCTGCACCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTACACGTACAAGGAGCT	164
Human Beta-ENaC	AAGGCCTGCATCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTACACGTACAAGGAGCT	250
	*** ***** *****	
Cyno Beta-ENaC	GCTGGTGTGGTACTGCGATAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGTATCA	214
Human Beta-ENaC	GCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGCATCA	300

Cyno Beta-ENaC	TCTGCGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCGTGTGGTTCTGCTCACCTGCTC	264
Human Beta-ENaC	TCTGTGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCTGCTCACCTGCTC	350
	*** *****	
Cyno Beta-ENaC	TTCAGTCTCTCGTCTGCTGGCAGTGGGCATCTTCATCAGGACCTACTT	314
Human Beta-ENaC	TTCGCCCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGCATCTTCATCAGGACCTACTT	400
	*** * ** *****	

ES 2 574 204 T3

Cyno Beta-ENaC	GAGCTGGGAGGTCAGCGTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACT	364
Human Beta-ENaC	GAGCTGGGAGGTCAGCGTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACT	450

Cyno Beta-ENaC	TCCCGCCGTCACCATCTGCAATGCTAGCCCTTCAAGTATTCCAAAGTC	414
Human Beta-ENaC	TCCCTGCCGTCACCATCTGCAATGCTAGCCCTTCAAGTATTCCAAAATC	500
	**** *****	
Cyno Beta-ENaC	AAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAAGCTGTCTGGAGAG	464
Human Beta-ENaC	AAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAAGCTGTCTGGAGAG	550

Cyno Beta-ENaC	AATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGACCTGAACT	514
Human Beta-ENaC	AATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTGAACT	600

Cyno Beta-ENaC	CTTCCATCTGGAACCACACACCACTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCC	564
Human Beta-ENaC	TCTCCATCTGGAACCACACACCCCTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCC	650

Cyno Beta-ENaC	CACCACCCCATGGTCCTCGATCTCTTTGGAGATAACCACAATGGCTTAAC	614
Human Beta-ENaC	CACCACCCCATGGTCCTTGTATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAAC	700

Cyno Beta-ENaC	AAACAGCTCAGCATCAGAAAAGATCTGTAATGCCCATGGGTGCAAAATGG	664
Human Beta-ENaC	AAGCAGCTCAGCATCAGAAAAGATCTGTAATGCCCATGGGTGCAAAATGG	750
	** *****	
Cyno Beta-ENaC	CCATGAGACTATGTAGCCTCAACGGGACCCAGTGCACCTTCCGGAACCTC	714
Human Beta-ENaC	CCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGGACCCAGTGTACCTTCCGGAACCTC	800

Cyno Beta-ENaC	ACCAGCGCTACCCAGGCGATGACAGAGTGGTACAGCCTGCAGGCCACCAA	764
Human Beta-ENaC	ACCAGTGCTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATCTGCAGGCCACCAA	850

Cyno Beta-ENaC	CATCTTTGCGCAGGTGCCGAGCAGGAGCTGGTGGAGATGAGCTACCCCG	814
Human Beta-ENaC	CATCTTTGCACAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTACCCCG	900
	***** *****	
Cyno Beta-ENaC	GCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTGTTTGGAGCTGAGCCCTGCAACTAC	864
Human Beta-ENaC	GCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTCCGAGCTGAGCCCTGCAACTAC	950

Cyno Beta-ENaC	CGGAACTTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTT	914
Human Beta-ENaC	CGGAACTTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTT	1000

Cyno Beta-ENaC	CAACTGGGGCATGACAGAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCCTGGACCTG	964
Human Beta-ENaC	CAACTGGGGCATGACAGAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCCTGGAACTG	1050

Cyno Beta-ENaC	AATTGGCCTGAAGTTGATCCTGGACATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCC	1014
Human Beta-ENaC	AATTGGCCTGAAGTTGATCCTGGACATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCC	1100
	**** *****	
Cyno Beta-ENaC	TTCTCGCGTCCACGGCTGGGGTCAGGCTGATGCTTACGAGCAGAGGTC	1064
Human Beta-ENaC	TTCTTGCGTCCACGGCCGGGGTCAGGCTGATGCTTACGAGCAGAGGTC	1150

Cyno Beta-ENaC	ATACCCCTTCATCAGAGACGAGGGCATCTATGCCATGTCGGGGACAGAGA	1114
Human Beta-ENaC	ATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCGGGGACAGAGA	1200

ES 2 574 204 T3

```

*****
Cyno Beta-ENaC  CGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTAC 1164
Human Beta-ENaC  CGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTAC 1250
*****

Cyno Beta-ENaC  AGCCCGTGCACCGTGAATGGCTCCGAGGTCCCCGTCCAAAATTCTACAG 1214
Human Beta-ENaC  AGCCCGTGCACCGTGAATGGTTCTGAGGTCCCCGTCCAAAATTCTACAG 1300
*****

Cyno Beta-ENaC  TGACTACAACACGACCTACTCCATCCAGGCCGTCTTCGCTCCTGCTTCC 1264
Human Beta-ENaC  TGACTACAACACGACCTACTCCATCCAGGCCGTCTTCGCTCCTGCTTCC 1350
*****

Cyno Beta-ENaC  AAGACCACATGATCCGTAGCTGCAAGTGTGGGCACTACCTTACCCACTG 1314
Human Beta-ENaC  AAGACCACATGATCCGTAAGTGTGGGCACTACCTTACCCACTG 1400
*****

Cyno Beta-ENaC  CCCCCTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTCCCAGACTGGGCCCA 1364
Human Beta-ENaC  CCCCCTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTCCCAGACTGGGCCCA 1450
*****

Cyno Beta-ENaC  TTGCTACTCAGATCTGCAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGCATTG 1414
Human Beta-ENaC  TTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGCATTG 1500
*****

Cyno Beta-ENaC  GCATGTGCAAGGAATCCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACTATCTCC 1464
Human Beta-ENaC  GCATGTGCAAGGAGTCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACTATCTCC 1550
*****

Cyno Beta-ENaC  ATGGCTGACTGGCCTTCTGAGGCCCTCGAGGACTGGATTTTCCACGTCTT 1514
Human Beta-ENaC  ATGGCTGACTGGCCTTCTGAGGCCCTCGAGGACTGGATTTTCCACGTCTT 1600
*****

Cyno Beta-ENaC  GTCTCAGGAGCGGGACCAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAA 1564
Human Beta-ENaC  GTCTCAGGAGCGGGACCAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAA 1650
*****

Cyno Beta-ENaC  TTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAAGAATTTAACTATCGCACCATTGAA 1614
Human Beta-ENaC  TTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAAGAATTTAACTATCGCACCATTGAA 1700
*****

Cyno Beta-ENaC  GAATCAGCAGCCAATAACCTCGTCTGGCTGCTCTCAAATCTGGGTGGCCA 1664
Human Beta-ENaC  GAATCAGCAGCCAATAACCTCGTCTGGCTGCTCTCAAATCTGGGTGGCCA 1750
*****

Cyno Beta-ENaC  GTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTTGGGG 1714
Human Beta-ENaC  GTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTTGGGG 1800
*****

Cyno Beta-ENaC  AGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTG 1764
Human Beta-ENaC  AGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTG 1850
*****

Cyno Beta-ENaC  GCCAAGAGCCTCCGGCAGCGGCGAGCCCAAGCCAGCTACTCCGGCCCACC 1814
Human Beta-ENaC  GCCAAGAGCCTACGGCAGCGGCGAGCCCAAGCCAGCTACTCCGGCCCACC 1900
*****

Cyno Beta-ENaC  GCCCACGGTGGCTGAGCTGGTGGAGGCCACACCAACTTCGGCTACCAGC 1864
Human Beta-ENaC  GCCCACGGTGGCCGAGCTGGTGGAGGCCACACCAACTTCGGCTACCAGC 1950
*****

```

ES 2 574 204 T3

Cyno Beta-ENaC	CTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAACACCGGGCCCTACCCAGTGAGCAG	1914
Human Beta-ENaC	CTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAACTGGGCCCTACCCAGTGAGCAG	2000

Cyno Beta-ENaC	GCCCTGCCCATCCCGGGCACCCCGCCCCCAACTATGACTCCCTGCGTCT	1964
Human Beta-ENaC	GCCCTGCCCATCCCGAGCACCCCGCCCCCAACTATGACTCCCTGCGTCT	2050

Cyno Beta-ENaC	GCAGCCACTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATCTAA-	2013
Human Beta-ENaC	GCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATCTAAC	2100

Cyno Beta-ENaC	---GCGGCCGCTAG---AAATAGCTTGATCTGGTTA---CCACTAAACCA	2055
Human Beta-ENaC	CCTGCCCTGCCACCCCGGGCGGTGAAACTACTGAGCAGCCAAGACT	2150
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	GC--CTCAAGAACAC--CGAATGGAGTCTCT---AAGCTACATAATACC	2098
Human Beta-ENaC	GTGCGCCGAGGCCCTACTGTATGGTGCCTCTCCAAAGGGTCGGGAGGGT	2200
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	AACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCAA--AATGTAGCCATTTCGTATC	2147
Human Beta-ENaC	AGTCTCCAGGCCAGAGCTTGTGTCCTTCAACAGAGAGGCCAGCGGCAAC	2250
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	TGCTCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTACATTCTAAAAA	2197
Human Beta-ENaC	TGGTCCGTACTGGCCAAGGGCTCTGTAGAATCAGGTGCTGGTACAGGA	2300
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCCC--CCCCCCCCCTGCAGAGATCTG	2245
Human Beta-ENaC	TGCAGGAATAAATTGTATCTTACCTGGTTCTACCCTCGTCCCTACCTG	2350
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	CTAGCTTGAGTATTCTATAGAGTCACCTAAATACT-----	2280
Human Beta-ENaC	TCCTGATCCTGGTCTGAAGACCCCTCGGAACACCCTCTCCTGGTGGCAG	2400
	* * * * *	
Cyno Beta-ENaC	-----	
Human Beta-ENaC	GCCACTTCCCTCCCAGTGCCAGTCTCCATCCACCCAGAGAGGAACAGGC	2450
Cyno Beta-ENaC	-----	
Human Beta-ENaC	GGGTGGGCAIGTGGTTTTCTCCTTCCIGGCCTGGCTGGCCCTGGGGC	2500
Cyno Beta-ENaC	-----	
Human Beta-ENaC	AGGGGTGGTGGAGAGATGGAAGGCATCAGGTGTAGGGACCCTGCCAAGT	2550
Cyno Beta-ENaC	-----	
Human Beta-ENaC	GGCACCTGATTTACTCTAGAAAATAAAAGTAGAAAATACTGAGTCCA	2597
Cyno Beta-ENaC	(SEQ ID NO: 221)	
Human Beta-ENaC	(SEQ ID NO: 222)	

Los codones de inicio (ATG) y parada (TAA) de las secuencias de cyno y de humano están subrayadas. Los nucleótidos que coinciden entre las secuencias de humano y cyno están marcados con un asterisco (*).

- Se describe que el agente de RNAi del β -ENaC comprende una secuencia que es idéntica en los ARNm del β -ENaC de humano, rata y cyno. Esta identidad de secuencia facilita las pruebas con animales antes de las pruebas con humanos. Se describe que el agente de RNAi del β -ENaC comprende una secuencia que es idéntica en los ARNm del β -ENaC de humano, ratón y cyno.

Otras descripciones de un agente de RNAi específico del β -ENaC

- Se describe que el agente de RNAi del β -ENaC comprende una secuencia que no coincide con ningún otro ARNm o gen. Se describe que el agente de RNAi del β -ENaC comprende una secuencia que difiere de todos los demás ARNm o genes conocidos que no son del β -ENaC en al menos 0, 1, 2 o 3 nucleótidos.

Se describe que el agente de RNAi del β -ENaC se administra a un paciente que lo necesita (p. ej., un paciente que

padece fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasemia e hipertensión asociada a la obesidad).

Al paciente también se le puede administrar más de un agente de RNAi específico del β -ENaC. Se describe que el agente o agentes de RNAi del β -ENaC se pueden administrar facultativamente junto con uno o varios agentes farmacéuticos adicionales adecuados para dicha enfermedad. Se describe que el agente o agentes de RNAi específicos del β -ENaC se pueden administrar facultativamente junto con cualquier otro tratamiento adicional adecuado, en donde el tratamiento adicional puede ser una composición o un método.

En el caso de la fibrosis quística, del pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), del síndrome de Liddle, de la hipertensión, de la alcalosis, de la hipopotasemia y/o de la hipertensión asociada a la obesidad, el agente o agentes de RNAi y el tratamiento o tratamientos adicionales de la enfermedad se pueden administrar en cualquier orden, de forma simultánea o secuencial, o en una o varias dosis con el tiempo.

Definiciones

Por comodidad, se da a conocer a continuación el significado de determinados términos y frases utilizados en la especificación, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas.

15 Agente de RNAi

Se describe un agente de RNAi del β -ENaC u otra composición que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico antisentido complementaria a un ácido nucleico del β -ENaC (o porción del mismo), o un vector de expresión recombinante que codifica el siRNA o la composición que comprende el ácido nucleico antisentido que puede funcionar como un RNAi según se define a continuación. Tal y como se usa en la presente memoria, un ácido nucleico «antisentido» comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un ácido nucleico «sentido» que codifica la proteína del β -ENaC (p. ej., complementaria a la hebra codificante de un ADN bicatenario, complementaria a un ARNm, o complementaria a la hebra codificante de un gen o ácido nucleico del β -ENaC).

Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología «agente de RNAi del β -ENaC», «agente de RNAi específico del β -ENaC», «agente de iRNA del β -ENaC», «siRNA específico del β -ENaC», «siRNA del β -ENaC» y similares se refieren a un siRNA (ARN pequeño inhibidor), shRNA (ARN horquillado pequeño), agente de iRNA (ARN interferente), agente de RNAi (interferencia por ARN), dsRNA (ARN bicatenario), microARN y similares, y se refieren a una composición que específicamente actúa de modo selectivo, que es específica y/o que se fija a un ARNm del β -ENaC. Tal y como se usa en la presente memoria, el término «ácido nucleico antisentido» o «composición que comprende un ácido nucleico antisentido» y similares quiere decir en sentido amplio que abarca cualquier composición que comprende al menos una hebra de ácido nucleico que es antisentido a su diana; esto incluye, pero sin limitarse a ellos, cualquier siRNA, shRNA, iRNA, dsRNA, microRNA, oligonucleótido antisentido, y cualquier otra composición que comprende un ácido nucleico antisentido. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos «iRNA» y «RNAi» se refieren a un agente que contiene ARN (o un derivado del mismo) y que interviene en la escisión selectiva de otro transcrito de ARN a través de la vía del complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por su nombre en inglés). En una realización, el agente de RNAi es una composición oligonucleotídica que activa el complejo/vía del RISC. En otra realización, el agente de RNAi comprende una secuencia de la hebra antisentido (oligonucleótido antisentido).

El agente o agentes de RNAi actúan (p. ej., se fijan, se alinean, etc.) selectivamente sobre el ARNm del β -ENaC. El uso del agente de RNAi específico del β -ENaC da lugar a una disminución de la actividad, nivel y/o expresión del β -ENaC, p. ej., una «atenuación» o «genosupresión» del gen diana o secuencia diana. En particular, en el caso de un estado patológico caracterizado por la sobreexpresión o hiperactividad del β -ENaC, la administración de un agente de RNAi del β -ENaC atenúa selectivamente el β -ENaC lo suficiente para que se restaure un nivel normal de la actividad del β -ENaC y/o un nivel normal de reabsorción de Na^+ .

Se describe que el RNAi comprende una sola hebra (tal como un shRNA, tal y como se describe en la presente memoria).

Se describe que una o ambas hebras están melladas.

Se describe que un oligonucleótido o polinucleótido monocatenario de agente de RNAi puede comprender la hebra sentido y/o antisentido. Véase, p. ej., Sioud 2005 *J. Mol. Biol.* 348: 1079-1090 y las referencias citadas en ésta. Así pues, se describen agentes de RNAi con una sola hebra que comprenden bien la hebra sentido o bien la antisentido de un agente de RNAi descrito en la presente memoria.

Los siRNA que son particularmente útiles incluyen los que se pueden fijar específicamente a una región del ARNm del β -ENaC y tienen una o varias de las siguientes cualidades: fijación al segmento codificante del β -ENaC; fijación en, o cerca de ella, la unión entre la región sin traducir en 5' y el inicio del segmento codificante; fijación en, o cerca de él, el sitio de inicio de la traducción del ARNm; fijación en, a través, o cerca de, las uniones de los exones e intrones; poca o ninguna fijación a los ARNm o transcritos de otros genes (poco o ningún «efecto inespecífico»); fijación al ARNm del β -ENaC en, o cerca de, una región o regiones que no es una región bicatenaria ni un tallo, p. ej.,

- en un bucle o porción monocatenaria; desencadenamiento de poca o ninguna inmunogenia; fijación a un segmento de la secuencia del ARNm del β -ENaC que se conserva entre diferentes especies de animales (entre ellas humano, ratón, rata, cyno, etc.), ya que la presencia de una secuencia conservada facilita la comprobación con diferentes animales de laboratorio; fijación a la región o regiones bicatenarias del ARNm; fijación a una región rica en AT (p. ej., rica en AT al menos aproximadamente al 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60%); y/o carencia de secuencias concretas que se conoce, o que se sospecha, que disminuyen la actividad del siRNA, p. ej., la presencia de una secuencia GG en el extremo 5' puesto que podría disminuir la separación de la porción bicatenaria del siRNA. Se describe que el agente de RNAi específico del β -ENaC puede ser un ARN bicatenario (dsRNA) que tiene una cualquiera o varias de estas cualidades.
- 10 La terminología «ARN bicatenario» o «dsRNA», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras; p. ej., una composición que incluye una molécula o complejo de moléculas de ARN que tienen una región bicatenaria hibridada (a saber, un región donde las bases nucleotídicas de la primera hebra y de la segunda hebra están emparejadas) que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, que se dirá que tienen orientaciones «sentido» y
- 15 «antisentido» con respecto a un ARN diana. La hebra antisentido, con respecto al ARNm diana, también se denomina la hebra «guía» y la hebra sentido también se denomina la hebra «pasajera». La hebra pasajera puede incluir al menos uno o varios de lo siguiente: uno o varios nucleótidos adicionales (p. ej., un abultamiento o un bucle de 1 nt) en comparación con la otra hebra, una mella, un hueco, etc., en comparación con otra hebra. En diferentes realizaciones, el agente de RNAi comprende una primera hebra y una segunda hebra. En diferentes realizaciones, la primera hebra es la hebra sentido y la segunda hebra es la hebra antisentido. En otras realizaciones, la primera hebra es la hebra antisentido y la segunda hebra es la hebra sentido.

- La región bicatenaria puede ser de cualquier longitud que permita la degradación específica de un ARN diana deseado a través de una vía de RISC, pero típicamente oscilará entre 15 y 30 pb de longitud. La doble hebra puede ser de cualquier longitud en este margen, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pb y cualquier submargen entre estos, que incluye, pero sin limitarse a ellos, 15-30 pb, 15-26 pb, 15-23 pb, 15-22 pb, 15-21 pb, 15-20 pb, 15-19 pb, 15-18 pb, 15-17 pb, 18-30 pb, 18-26 pb, 18-23 pb, 18-22 pb, 18-21 pb, 18-20 pb, 19-30 pb, 19-26 pb, 19-23 pb, 19-22 pb, 19-21 pb, 19-20 pb, 19 pb, 20-30 pb, 20-26 pb, 20-25 pb, 20-24 pb, 20-23 pb, 20-22 pb, 20-21 pb, 20 pares de bases, 21-30 pb, 21-26 pb, 21-25 pb, 21-24 pb, 21-23 pb, 21-22 pb, 21 pb, 22 pb o 23 pb. Los dsRNA generados en la célula mediante el procesamiento con Dicer y enzimas similares están por lo general en el margen de aproximadamente 19 a aproximadamente 22 pb de longitud. Una hebra de la región bicatenaria de un dsRNA comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región de un ARN diana. Las dos hebras que forman la estructura bicatenaria pueden ser de una sola molécula de ARN que tiene al menos una región bicatenaria autocomplementaria, o se puede formar de dos o más moléculas de ARN independientes que se hibridan para formar la doble hebra. Cuando la región bicatenaria se forma a partir de las dos regiones autocomplementarias de una única molécula, la molécula puede tener una región bicatenaria separada por una cadena monocatenaria de nucleótidos (en la presente memoria se les denomina un «bucle de horquilla», p. ej., como el encontrado en una construcción de shRNA) entre el extremo en 3' de una hebra y el extremo en 5' de la otra hebra correspondiente que forma la estructura bicatenaria. El bucle de horquilla puede comprender al menos un nucleótido sin aparear; en algunas realizaciones, el bucle de horquilla puede comprender al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 23 o más nucleótidos sin aparear. Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un dsRNA están comprendidas por moléculas de ARN independientes, estas moléculas no necesitan estar, pero pueden estarlo, covalentemente conectadas. Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por un bucle de horquilla, a la construcción, por lo general se le denomina un «shRNA» en la presente memoria y en la técnica. Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente mediante medios diferentes a un bucle de horquilla, la estructura conectora se denomina «conector».

Interferencia por ARN

- La interferencia por ARN (RNAi, por su nombre en inglés) es una técnica de silenciamiento génico postranscripcional selectivo que utiliza ARN bicatenario (dsRNA) para degradar el ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el dsRNA. El proceso de la RNAi se produce cuando la ribonucleasa III (Dicer) escinde los dsRNA más grandes en fragmentos más pequeños llamados siRNA. Los siRNA (ARN interferentes pequeños) suelen tener aproximadamente de 21 a 23 nucleótidos de longitud y comprenden dobles hebras de aproximadamente 19 pares de bases. A continuación, los segmentos de ARN más pequeños intervienen en la degradación del ARNm diana. También se ha implicado a Dicer en la escisión de los ARN temporales pequeños (stRNA, por su nombre en inglés) de 21 y 22 nucleótidos a partir del ARN precursor de estructura conservada que están implicados en el control traduccional. Hutvagner et al., 2001, *Science*, 293, 834. La respuesta de RNAi también da a conocer un complejo endonucleásico, que se suele denominar habitualmente complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por su nombre en inglés), que interviene en la escisión del ARNm monocatenario complementario a la hebra antisentido del siRNA. La escisión del ARN diana tiene lugar en medio de la región complementaria a la hebra antisentido de la doble hebra del siRNA.

En un aspecto, un agente de interferencia por ARN incluye un ARN monocatenario que interacciona con un secuencia del ARN diana para dirigir la escisión del ARN diana. Sin quererse comprometer con una teoría, el ARN

bicatenario largo que se introduce en las células vegetales y de los invertebrados se degrada en siRNA por una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp et al., *Genes Dev.* 2001, 15: 485). Dicer, una enzima de tipo ribonucleasa III, procesa el dsRNA en los ARN interferentes pequeños de 19-23 pares de bases con los extremos protuberantes en 3' característicos de dos bases (Bernstein et al., (2001) *Nature* 409: 363). A continuación, los siRNA se incorporan en un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), donde una o varias helicasas densemparejan la doble hebra del siRNA, lo que permite que una de las hebras de siRNA ahora desapareadas actúe como una hebra «guía» que guía el reconocimiento de la diana (Nykanen et al., (2001) *Cell* 107: 309). Tras la fijación de la hebra guía antisentido al ARNm diana adecuado, una o varias endonucleasas contenidas en RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir et al., (2001) *Genes Dev.* 15: 188). Así pues, en un aspecto, la presente descripción se refiere a un ARN monocatenario que favorece la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen diana.

La interferencia por ARN también se ha estudiado en una serie de sistemas. El trabajo con los lisados embrionarios de *Drosophila* (Elbashir et al., 2001, *EMBO J.* 20: 6877 y Tuschl et al., publicación de PCT internacional n.º WO 01/75164) ha revelado ciertos requisitos para la longitud, estructura, composición química y secuencia del siRNA que son esenciales para mediar en la actividad eficaz del RNAi en una serie de sistemas, entre ellos y en especial, los mamíferos. Estos estudios han demostrado que los siRNA de doble cadena de 21 nucleótidos son más activos cuando contienen dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3'. Se toleraba la sustitución de los nucleótidos protuberantes de los extremos 3' de los siRNA por desoxinucleótidos (2'-H). Además, para la actividad del siRNA se requiere normalmente un 5'-fosfato en la hebra complementaria del siRNA bicatenario diana. Lo más importante para el uso terapéutico es que los siRNA bicatenarios de menos de 50 pb o así no activan la respuesta del interferón en las células de mamíferos. Véase, p. ej., Tuschl et al., WO 01/752164.

Las moléculas de dsRNA (agentes de RNAi) descritas en la presente memoria son, así pues, útiles para la interferencia por ARN del β -ENaC.

Peculiaridades de un agente de RNAi: hebra sentido, hebra antisentido y extremos protuberantes (optativo)

Los agentes de RNAi descritos comprenden una primera hebra y una segunda hebra, p. ej., una hebra sentido y una hebra antisentido y, facultativamente, uno o ambos extremos de la doble hebra contienen nucleótidos desapareados que se denominan extremos protuberantes en la presente memoria.

La terminología «hebra antisentido» se refiere a la hebra de un agente de RNAi que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «región de complementariedad» se refiere a la región en la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, según se define en la presente memoria. Cuando la región de complementariedad no es totalmente complementaria a la secuencia diana, las discordancias pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. Por lo general, las discordancias más toleradas están en las regiones terminales, p. ej., a menos de 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

El término «hebra sentido», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la hebra de un agente de RNAi que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido tal y como está definido este término en la presente memoria.

La secuencia de un gen puede variar entre individuos, en especial en las posiciones vacilantes dentro del segmento codificante o en la región sin traducir; los individuos también pueden diferir entre sí por la secuencia codificante, lo que da lugar a diferencias adicionales en el ARNm. La secuencia de las hebras sentido y antisentido del agente de RNAi pueden, así pues, estar diseñadas para corresponder a la de un paciente concreto, si fuera necesario y cuando sea necesario. Los agentes de RNAi también pueden tener modificada la secuencia para reducir la inmunogenia, la fijación a ARNm indeseados (p. ej., los «efectos inespecíficos») o para incrementar su estabilidad en la sangre. Estas variantes de secuencia son independientes de la modificación química de las bases o de 5' o de 3' o de otras caperuzas terminales de los agentes de RNAi.

Los agentes de RNAi también pueden tener extremos protuberantes con 0, 1 o 2 protuberancias; en el caso de un extremo protuberante de 0 nt, se trata de extremos romos. Un agente de RNAi puede tener 0, 1 o 2 extremos romos. En un «agente de RNAi con extremo romo», ambas hebras terminan en un par de bases; así pues, una molécula con extremo romo carece de nucleótidos protuberantes monocatenarios en 3' o 5'.

Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología «extremo protuberante» o «nucleótido protuberante» se refiere a al menos un nucleótido desapareado que sobresale desde el extremo de al menos una de las dos hebras de la estructura bicatenaria de un agente de RNAi. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una hebra de un dsRNA se extiende más allá del extremo en 5' de la otra hebra, o viceversa, el nucleótido o nucleótidos desapareados forman el extremo protuberante. Un dsRNA puede comprender un extremo protuberante de al menos un nucleótido; como alternativa, el extremo protuberante puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Un extremo protuberante puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. El extremo o extremos protuberantes pueden estar en la hebra sentido, la hebra antisentido o cualquier combinación de las mismas.

Además, el nucleótido o nucleótidos de un extremo protuberante pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3', o en ambos extremos de una hebra antisentido o sentido de un dsRNA.

Facultativamente, el agente de RNAi puede comprender también una caperuza. El término «caperuza» y similares incluyen un resto químico unido al extremo de una doble hebra de nucleótidos bicatenarios, pero se utiliza en la presente memoria para excluir un resto químico que es un nucleótido o nucleósido. Una «caperuza en 3'» está unida al extremo 3' de un nucleótido u oligonucleótido. Una «caperuza en 5'» está unida al extremo 5' de un nucleótido u oligonucleótido. En una realización, las caperuzas del extremo 3' son como se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 2005/021749 y WO 2007/128477.

Así pues, la presente descripción contempla un agente de RNAi específico del β -ENaC que comprende una hebra antisentido (que puede ser contigua o estar conectada a través de un conector o un bucle) en un agente de RNAi. Un agente de RNAi puede comprender una hebra antisentido y una hebra sentido que, juntas, comprenden una región bicatenaria o complementaria. Facultativamente, también puede comprender uno o dos extremos protuberantes y/o una o dos caperuzas. El agente de RNAi se utiliza para inducir la interferencia por ARN del β -ENaC.

15 Secuencias diana y complementaria

Los agentes de RNAi descritos actúan selectivamente (p. ej., se fijan, se hibridan, etc., específicamente) sobre el ARNm que codifica el gen del β -ENaC. El uso del agente de RNAi específico del β -ENaC da lugar a una disminución de la actividad, nivel y/o expresión del β -ENaC, p. ej., una «atenuación» o «genosupresión», del gen diana o de la secuencia diana. En particular, en el caso de una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión o la hiperactividad del β -ENaC, la administración de un agente de RNAi del β -ENaC atenúa lo suficiente el gen del β -ENaC para restaurar un nivel normal de actividad del β -ENaC y/o un nivel normal de reabsorción de Na^+ .

Tal y como se usa en la presente memoria, «secuencia diana» o «gen diana» se refiere a una porción contigua de la secuencia nucleotídica de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen, p. ej., un gen del β -ENaC, que incluye el ARNm que es un producto de un procesamiento de ARN de un producto de transcripción primaria. La porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga para servir de sustrato para la escisión dirigida por iRNA en esa porción o cerca de ella. Por ejemplo, la secuencia diana tendrá por lo general de 15 a 30 nt de longitud, que incluye todos los submárgenes entre ellos. Como ejemplos no limitantes, la secuencia diana puede tener de 15-30 nt, 15-26 nt, 15-23 nt, 15-22 nt, 15-21 nt, 15-20 nt, 15-19 nt, 15-18 nt, 15-17 nt, 18-30 nt, 18-26 nt, 18-23 nt, 18-22 nt, 18-21 nt, 18-20 nt, 19-30 nt, 19-26 nt, 19-23 nt, 19-22 nt, 19-21 nt, 19-20 nt, 19 nt, 20-30 nt, 20-26 nt, 20-25 nt, 20-24 nt, 20-23 nt, 20-22 nt, 20-21 nt, 20 nt, 21-30 nt, 21-26 nt, 21-25 nt, 21-24 nt, 21-23 nt o 21-22 nt, 21 nt, 22 nt o 23 nt. Las hebras sentido y antisentido del RNAi comprenden una secuencia complementaria a la del ácido nucleico diana, el β -ENaC.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término «complementario» se refiere a la capacidad que tiene un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia nucleotídica para hibridarse y formar una estructura bicatenaria en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia nucleotídica. Tales condiciones pueden, por ejemplo, ser rigurosas, p. ej., NaCl a 400 mM, PIPES a 40 mM, pH 6,4, EDTA a 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido del lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tales como unas condiciones fisiológicamente relevantes como las que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto en la técnica podrá determinar el conjunto de condiciones más adecuadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación última de los nucleótidos hibridados.

Secuencias «complementarias», tal y como se usa en la presente memoria, también pueden incluir, o estar formadas totalmente de, pares de bases que no son de Watson y Crick y/o pares de bases formadas de nucleótidos no naturales y modificados, siempre y cuando se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse. Tales pares de bases que no son de Watson y Crick incluyen, pero sin limitarse a él, el apareamiento de bases vacilantes G:U o de Hoogsteen.

La terminología «complementario», «totalmente complementario» y «sustancialmente complementario» en la presente memoria puede además utilizarse con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un dsRNA, o entre la hebra antisentido de un agente de RNAi y una secuencia diana, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

Tal y como se usa en la presente memoria, un polinucleótido que es «sustancialmente complementario a al menos parte de» un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (p. ej., un ARNm que codifica el β -ENaC). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm del β -ENaC si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción ininterrumpida de un ARNm que codifica el β -ENaC.

Las secuencias complementarias dentro de un agente de RNAi, p. ej., dentro de un dsRNA, tal y como se describe en la presente memoria, incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos con sus bases apareadas que comprenden una primera secuencia nucleotídica de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia

nucleotídica que abarca toda la longitud de una o ambas secuencias nucleotídicas. Tales secuencias se pueden denominar «completamente complementarias» una con respecto a la otra en la presente memoria. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina «sustancialmente complementaria» con respecto a una segunda secuencia de la presente memoria, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias o pueden formar uno o varios, pero generalmente no más de 5, 4, 3 o 2, pares de bases discordantes tras la hibridación para formar una doble hebra de hasta 30 pares de bases, al mismo tiempo que conserva la capacidad para hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final, p. ej., la inhibición de la expresión génica mediante una vía de RISC. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, uno o varios extremos protuberantes monocatenarios, tales extremos protuberantes no se deben considerar discordancias con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, una doble hebra que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es totalmente complementaria al oligonucleótido más corto, aún se puede denominar «completamente complementaria» para los propósitos descritos en la presente memoria. El término extremo protuberante describe un nucleótido desapareado en el extremo 3' o 5' de una doble hebra nucleotídica bicatenaria, tal y como se describe más arriba. En una realización, el extremo protuberante tiene de 0 a 4 nt de longitud y se encuentra en el extremo 3'.

Así pues, el agente de RNAi descrito es complementario o sustancialmente complementario a una secuencia diana del β-ENaC diana y es bicatenario al comprender una hebra sentido y una hebra antisentido (que pueden ser contiguas, estar unidas por un bucle o, si no, juntada), donde la región bicatenaria puede tener de 15 a 36 pb de longitud (en particular, por ejemplo, 19-22 pb o 19-23 pb de longitud) y puede además comprender facultativamente un extremo protuberante en 3' o 5' y el agente de RNAi puede además comprender una caperuza en 3'. El agente de RNAi interviene en la interferencia por RNA, disminuye o inhibe el nivel, la expresión y/o la actividad del β-ENaC y/o establece o restablece un nivel aproximadamente normal de la actividad del ENaC y/o β-ENaC u otra función biológica relacionada con el ENaC.

25 Agentes de RNAi que disminuyen el nivel, la expresión y/o la actividad del β-ENaC

Los agentes de RNAi que actúan selectivamente sobre el β-ENaC incluyen los que se fijan a una secuencia del β-ENaC dada a conocer en la presente memoria y que se encargan de reducir el β-ENaC a través de un mecanismo de RNAi. Los siRNA de ejemplo contra el β-ENaC se dan a conocer, p. ej., en la tabla 1.

Los agentes de RNAi silencian, inhiben la expresión, reducen la expresión y/o suprimen la expresión del gen del β-ENaC, de tal manera que se consigue un nivel aproximadamente normal de la actividad, de la expresión y/o del nivel del β-ENaC y/o de la reabsorción del Na⁺.

Además, en diferentes realizaciones, según la enfermedad y el contexto biológico, es aceptable utilizar los agentes de RNAi de la presente descripción para establecer un nivel de expresión, actividad y/o nivel del β-ENaC que está por debajo del nivel normal o por encima del nivel normal.

35 Cualquier método conocido en la técnica se puede utilizar para medir los cambios de actividad, nivel y/o expresión del β-ENaC inducidos por un siRNA del β-ENaC. Las mediciones se pueden realizar en muchos momentos de tiempo, antes, durante o después de la administración del siRNA, para determinar el efecto del siRNA.

Los términos «silenciar», «inhibir la expresión de», «disminuir la expresión de», «suprimir la expresión de» y similares, en la medida en que se refieren al gen del β-ENaC, en la presente memoria se refieren al menos a la supresión parcial de la expresión de un gen del β-ENaC, tal y como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm del β-ENaC que se puede aislar, o detectar, de una primera célula o grupo de células en las que el gen del β-ENaC se transcribe y que se ha o se han tratado de tal manera que se inhibe la expresión de un gen del β-ENaC, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células, pero que no se ha o no se han tratado así (células de control). El grado de inhibición se expresa normalmente en términos de

$$\frac{(\text{ARNm en células de control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células de control})} \times 100\% \quad (\text{ecuación 1})$$

Como alternativa, el grado de inhibición se puede dar en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente unido a la expresión del gen del β-ENaC, p. ej., la cantidad de proteína codificada por un gen del β-ENaC, la alteración de la cantidad de líquido pulmonar o de la cantidad de mucosidad, etc. En principio, el silenciamiento del gen del β-ENaC se puede determinar en cualquier célula que expresa el β-ENaC, bien constitutivamente o mediante ingeniería genómica, y mediante cualquier ensayo adecuado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia o un control para determinar si un agente de RNAi determinado inhibe la expresión del gen del β-ENaC a un determinado nivel y, por lo tanto, está abarcado por la presente descripción, los ensayos dados a conocer en los ejemplos que vienen a continuación deberían servir como tal referencia.

55 Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión de un gen del β-ENaC se suprime hasta al menos aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% mediante la administración de un agente de RNAi dado a conocer en la presente descripción. En algunas realizaciones, un gen del β-ENaC se suprime hasta al menos

aproximadamente el 60%, 70% u 80% mediante la administración de un agente de RNAi dado a conocer en la presente descripción. En algunas realizaciones, un gen del β -ENaC se suprime hasta al menos aproximadamente el 85%, 90% o 95% o más mediante la administración de un agente de RNAi, tal y como se describe en la presente memoria.

- 5 La capacidad de un agente de RNAi para suprimir el β -ENaC se puede analizar primero *in vitro* (p. ej., con células problema tales como H441).

A los agentes de RNAi que pueden suprimir el β -ENaC *in vitro* se les puede analizar entonces su capacidad de inmunoestimulación con el uso de, por ejemplo, un ensayo con CMSP (células mononucleares de la sangre periférica). Los agentes de RNAi también se pueden analizar en pruebas con animales. Los animales problema y de control incluyen los que sobreexpresan o subexpresan el β -ENaC, tal y como se describe en, por ejemplo, Hummer et al. 2005, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3160-3166; Randrianarison et al., 2007 *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 294: 409-416; Cao et al. 2006 *Am. J. Physiol. Renal Physiol* y las referencias citadas en éstas. Los agentes de RNAi que suprimen o alteran el nivel, la actividad y/o la expresión del β -ENaC se pueden utilizar en medicamentos para tratar diferentes enfermedades relacionadas con el β -ENaC.

- 10

- 15 Con «reducir» en el contexto del β -ENaC o de un síntoma de una enfermedad relacionada con el β -ENaC se pretende hacer referencia a una disminución estadísticamente significativa de tal nivel. El descenso puede ser, por ejemplo, de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, o más. Si, para una enfermedad concreta, o para un individuo que padece una enfermedad concreta, el nivel de expresión del β -ENaC está elevado, el tratamiento con un agente de RNAi del β -ENaC de la presente descripción puede reducir en particular el nivel o la expresión del β -ENaC a un nivel que en la bibliografía se considera dentro del margen de lo normal para un individuo sin tal trastorno. El nivel o la expresión del β -ENaC se puede medir mediante la evaluación del ARNm (p. ej., mediante transferencias de tipo Northern o PCR) o de la proteína (p. ej., transferencias de tipo Western). El efecto de un agente de RNAi sobre la expresión del β -ENaC se puede determinar midiendo la tasa de transcripción génica del β -ENaC (p. ej., a través de transferencias de tipo Northern; o por reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa, o por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). La RT-PCR se ha utilizado para demostrar que el nivel de ARNm del β -ENaC es alto en el riñón, en el páncreas y en la próstata, y es medio en el hígado y en el bazo. Brauner-Osborne et al. 2001. *Biochem. Biophys. Acta* 1518: 237-248. Se pueden realizar mediciones directas de los niveles del β -ENaC (que se expresa en la superficie celular), p. ej., mediante transferencias de tipo Western de los tejidos en los que se expresa el β -ENaC.
- 20
- 25

- 30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «disminuye» hace referencia a cualquier disminución estadísticamente significativa de una actividad biológica y/o expresión del β -ENaC, lo que incluye el bloqueo completo de la actividad (a saber, la inhibición completa) y/o la expresión. Por ejemplo, «disminución» puede referirse a una disminución de al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% del nivel, de la actividad y/o de la expresión del β -ENaC.

- 35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «inhibe» o «que inhibe» el β -ENaC hace referencia a cualquier disminución estadísticamente significativa del nivel, de la actividad y/o de la expresión biológicos del β -ENaC, que incluye el bloqueo completo de la actividad y/o de la expresión. Por ejemplo, «inhibición» se puede referir a una disminución de al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% del nivel, actividad y/o expresión del β -ENaC. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «inhibe» hace referencia de igual modo a una disminución significativa del nivel, actividad y/o expresión, al mismo tiempo que se refiere a cualquier otro agente biológico o composición.
- 40

Con «nivel» se quiere hacer referencia a que el agente de RNAi del β -ENaC puede alterar el nivel del β -ENaC, p. ej., el nivel del ARNm del β -ENaC o el nivel de la proteína del β -ENaC o el nivel de la actividad del β -ENaC.

- 45 Algunas enfermedades, tales como la fibrosis quística, se caracterizan por la excesiva absorción de Na^+ mediada por el ENaC. En el caso de una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión y/o hiperactividad del β -ENaC, la administración de un agente de RNAi del β -ENaC reduce el nivel, la expresión y/o la actividad del β -ENaC. Sin embargo, un nivel excesivamente bajo de β -ENaC puede también conducir al deterioro de la eliminación del líquido pulmonar y la disfunción renal. Randrianarison et al. 2007 *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 294: 409-416. Así pues, la administración de un agente de RNAi del β -ENaC establece o restablece en concreto un nivel normal o aproximadamente normal de la actividad, expresión y/o nivel del β -ENaC.
- 50

- Con «normal» o «aproximadamente normal» en términos de nivel, expresión y/o actividad, se quiere hacer referencia a al menos: aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% y/o aproximadamente el 100%; y/o no más de: aproximadamente el 100%, aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130%, aproximadamente el 140% o aproximadamente el 150% del nivel, la expresión o la actividad del β -ENaC en una célula, tejido u órgano sano. Esto se puede medir con, por ejemplo, homogeneizados de pulmón o riñón, tal y como se describe en Gambling et al., 2004 *Kidney Intl.* 65: 1774-1781. En particular, la administración de la cantidad adecuada del agente de RNAi del β -ENaC adecuado restaura el nivel, la actividad y/o la expresión del β -ENaC, y/o los niveles de reabsorción de Na^+ de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 150%, más particularmente de aproximadamente el 60% a
- 55

- aproximadamente el 140%, más particularmente de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 130%, más particularmente de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 120%, más particularmente de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 110% y lo más particularmente hasta aproximadamente el 100%, del de una célula, tejido u órgano sano. El nivel de la actividad del β -ENaC también se puede medir indirectamente mediante el equilibrio del líquido pulmonar. El equilibrio del líquido pulmonar se puede estimar con el cálculo las proporciones del peso pulmonar desangrado, húmedo respecto a seco, lo que refleja la cantidad de agua pulmonar extravascular. Randrianarison et al., 2007 *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 294: 409-416. El nivel de la actividad del β -ENaC también se puede medir indirectamente mediante los estudios histológicos del pulmón, en particular de los bronquiolos, conductos alveolares, epitelio alveolar y vasos sanguíneos. Randrianarison et al. 2007; y Zhou et al., 2008 *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 178: 1245-1256. La administración de un RNAi del β -ENaC a un paciente con una enfermedad relacionada con el β -ENaC restaura, entonces y de forma concreta, el nivel, la actividad y/o la expresión del β -ENaC y el nivel de reabsorción de Na^+ a un nivel aproximadamente normal, tal y como se determina mediante las mediciones directas del ARNm del β -ENaC o los niveles de la proteína, o determinaciones indirectas, tales como el análisis de muestras histológicas o la cantidad de líquido pulmonar.
- 15 Además, según la enfermedad y su contexto biológico, es aceptable utilizar los agentes de RNAi de la presente descripción para establecer un nivel de expresión, actividad y/o nivel de β -ENaC que está por debajo del nivel normal o por encima del nivel normal.

Se conocen diferentes factores que alteran el nivel de ENaC o, específicamente, de β -ENaC. Las hormonas que incrementan la actividad fisiológica del ENaC incluyen la aldosterona, la vasopresina y la insulina. El β -ENaC está específicamente inducido por la vasopresina y la restricción de agua, así como durante la carga de bicarbonato sódico en las ratas. Estos diferentes factores se pueden utilizar como controles para determinar el efecto de un agente de RNAi sobre el nivel del β -ENaC.

Tipos de agentes de RNAi y modificación de los mismos

Se conoce bien en la técnica el uso de los agentes de RNAi o de composiciones que comprenden un ácido nucleico antisentido que disminuye la expresión de una proteína concreta en una célula. Un agente de RNAi comprende una secuencia complementaria a la hebra codificante de otro ácido nucleico (p. ej., un ARNm) y es capaz de formar puentes de hidrógeno con ella.

Las secuencias antisentido complementarias a un ARNm pueden ser complementarias a la región codificante, la región sin traducir en 5' o 3' del ARNm y/o una región que hace de puente entre las regiones codificante y sin traducir, y/o porciones de las mismas. Además, un agente de RNAi o una porción del mismo puede ser complementario a una región reguladora del gen que codifica el ARNm, por ejemplo, una secuencia de inicio de la transcripción o la traducción, o elemento regulador. En particular, un agente de RNAi o una porción del mismo puede ser complementario a una región que precede o abarca el codón de inicio en la hebra codificante o en la región sin traducir en 3' de un ARNm.

Las moléculas del agente de RNAi se pueden diseñar de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. El agente de RNAi puede ser complementario a toda la región codificante del ARNm del β -ENaC, pero más en particular, es un oligonucleótido que es antisentido de sólo una porción de la región codificante o no codificante del ARNm del β -ENaC. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción del ARNm del β -ENaC. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud.

El agente de RNAi puede tener modificaciones internamente o en uno o ambos extremos. Las modificaciones en los extremos pueden ayudar a estabilizar el agente de RNAi, protegiéndolo de la degradación por nucleasas en la sangre. Los agentes de RNAi pueden facultativamente estar dirigidos a las regiones del ARNm del β -ENaC que se sabe o que se predice que están cerca o en los sitios de ajuste del gen; p. ej., uniones de exón-intrón (como se describe en, por ejemplo, Saxena et al. 1998).

Los agentes de RNAi también se pueden diseñar facultativamente para que se hibriden a regiones del ARNm monocatenarias y/o predicho o conocido que están expuestas (p. ej., bucles).

Un agente de RNAi se puede construir por síntesis química y las reacciones de ligación enzimática con los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente de RNAi se puede sintetizar químicamente con los nucleótidos que se producen en la naturaleza o nucleótidos modificados de distintas maneras diseñados para disminuir los efectos inespecíficos y/o incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física de la doble hebra formada entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, p. ej., se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina.

Cada una de «G», «C», «A», «T» y «U» representan por lo general un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timina y uracilo en la base, respectivamente. Sin embargo, el término «ribonucleótido» o «nucleótido» también se puede referir a un nucleótido modificado o un resto de reemplazo de sustitución. El experto en la técnica es bien consciente de que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo se pueden reemplazar por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un

nucleótido que lleva tal resto de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende la inosina, ya que su base se puede aparear con los nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden reemplazar, en las secuencias nucleotídicas de dsRNA dadas a conocer en la presente descripción, por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier lugar en el oligonucleótido se pueden reemplazar con guanina y uracilo, respectivamente, para formar un apareamiento de bases vacilante G-U con el ARNm deseado. Las secuencias que contienen tales restos de reemplazo son adecuadas para las composiciones y los métodos presentados en la presente descripción.

El experto en la técnica reconocerá que la terminología «molécula de ARN» o «molécula de ácido ribonucleico» abarca no solo las moléculas de ARN que se expresan o encuentran en la naturaleza (a saber, que aparecen en la naturaleza), sino también los análogos que no se producen en la naturaleza y los derivados de ARN que comprenden uno o varios análogos o derivados de ribonucleótidos/ribonucleósidos como los descritos en la presente memoria o como se conoce en la técnica. Hablando estrictamente, un «ribonucleósido» incluye una base nucleosídica y un azúcar de ribosa, y un «ribonucleótido» es un ribonucleósido con uno, dos o tres restos de fosfato. Sin embargo, los términos «ribonucleósido» y «ribonucleótido» se pueden considerar que son equivalentes tal y como se usan en la presente memoria. El ARN puede tener modificada la estructura de la nucleobase o la estructura del esqueleto de ribosa-fosfato, p. ej., según se describe en la presente memoria a continuación. Sin embargo, las moléculas que comprenden análogos o derivados de ribonucleósido pueden conservar la capacidad de formar una doble hebra. Como ejemplos no limitantes, una molécula de ARN también puede incluir al menos un ribonucleósido modificado, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleósido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleósido terminal unido a un derivado de colesterilo o a un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico, un nucleósido bloqueado, un nucleósido abásico, un nucleósido modificado con 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleósido modificado con 2'-amino, un nucleósido modificado con 2'-alquilo, nucleósido de morfolino, un ribonucleótido sin cerrar (p. ej., un monómero nucleotídico acílico, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2008/147824), un fosforamidato o un nucleósido que comprende una base no natural, o una combinación de los mismos. Como alternativa, una molécula de ARN puede comprender al menos dos ribonucleósidos modificados, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, o más, hasta la longitud completa de la molécula de dsRNA. Las modificaciones no necesitan ser las mismas para cada uno de los muchos ribonucleósidos modificados en una molécula de ARN. Los ARN modificados que se contemplan para el uso en las composiciones descritas en la presente memoria son ácidos peptidonucleicos (PNA) que tienen la capacidad de formar la estructura bicatenaria requerida y que permiten o intervienen en la degradación específica de un ARN diana a través de una vía de RISC.

Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el agente de RNAi incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, β -D-galactosilquenosina, inosina, N^6 -isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N^6 -adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β -D-manosilquenosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio- N^6 -isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, seodouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

La presente descripción abarca cualquier variante modificada de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria. La variante modificada contiene la misma secuencia, pero se puede modificar para que contenga modificaciones en el fosfato, azúcar, base, nucleótido, etc. Por ejemplo, la variante modificada puede contener uno o varios de los nucleótidos modificados recogidos en la presente memoria, por ejemplo, una C reemplazada por una C modificada en 2'.

En un aspecto, un ribonucleósido modificado incluye un desoxirribonucleósido. En tal ejemplo, un agente de RNAi puede comprender uno o varios desoxinucleósidos, entre ellos, por ejemplo, uno o varios desoxinucleósidos protuberantes, o uno o varios desoxinucleósidos dentro de la porción bicatenaria de un dsRNA. Sin embargo, es evidente que bajo ninguna circunstancia es una molécula de ADN bicatenaria englobada por la terminología «agente de RNAi».

El reemplazo de los segmentos protuberantes de nucleótidos en el extremo 3' de una doble hebra de siRNA de 21 restos que tienen dos nucleótidos protuberantes en 3' por desoxirribonucleótidos no tiene ningún efecto adverso sobre la actividad de RNAi. El reemplazo de hasta cuatro nucleótidos en cada extremo del siRNA por desoxirribonucleótidos se ha tolerado bien, mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos no da lugar a ninguna actividad de RNAi. La publicación PCT internacional de n.º WO 01/68836 sugiere de forma preliminar que el siRNA podría incluir modificaciones en su esqueleto de fosfato-azúcar o bien en el nucleósido, para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. Kreuzer et al., solicitud de patente canadiense n.º 2.359.180, también describen determinadas modificaciones químicas para ser usadas en las construcciones de dsRNA para contrarrestar la activación de PKR, la proteína cinasa dependiente del ARN bicatenario, específicamente los nucleótidos con 2'-amino o 2'-O-metilo, y los nucleótidos que contienen un puente de 2'-O- o 4'-C-metileno. Otros nucleótidos protuberantes en el extremo 3' incluyen dT (desoxitimidina), 2'-O,4'-C-etilimidina

(eT) y fosfato de 2-hidroxietilo (hp).

Parrish et al. 2000, *Molecular Cell* 6: 1077-1087, analizaron determinadas modificaciones químicas que actúan selectivamente sobre el gen *unc-22* en *C. elegans* mediante el uso de transcritos de siRNA largos (> 25 nt). Los autores describen la introducción de restos de tiofosfato en estos transcritos de siRNA mediante la incorporación de análogos de nucleótidos con tiofosfato mediante las ARN polimerasas de T3 y T7, y observaron que los ARN con dos bases modificadas con fosforotioato también tenían disminuciones sustanciales en la eficacia de la RNAi. Además, Parrish et al describieron que la modificación con fosforotioato de más de dos restos desestabilizaba enormemente los ARN *in vitro* de tal manera que las actividades de interferencia no se podían ensayar. Id. en 1081. Los autores también analizaron determinadas modificaciones en la posición 2' del azúcar nucleotídico en los transcritos de siRNA largos y encontraron que la sustitución de los desoxinucleótidos por ribonucleótidos producía una disminución sustancial de la actividad de interferencia, en especial en el caso de las sustituciones de uridina por timidina y/o citidina por desoxicitidina. Id. Además, los autores analizaron determinadas modificaciones de bases, entre ellas, la sustitución, en las hebras sentido y antisentido del siRNA, por 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo y 3-(aminoalil)uracilo en lugar de uracilo, e inosina en lugar de guanosina. Mientras que la sustitución por 4-tiouracilo y 5-bromouracilo parecía tolerarse bien, Parrish describió que la inosina producía una disminución sustancial en la actividad de interferencia cuando se incorporaba en cualquier hebra. Parrish también describió que la incorporación de 5-yodouracilo y 3-(aminoalil)uracilo en la hebra antisentido también daba lugar a una disminución sustancial de la actividad de RNAi.

Los expertos en la técnica apreciarán que es posible sintetizar y modificar los siRNA cuando se desee, mediante el uso de cualquier método convencional conocido en la técnica (véase Henschel et al., 2004, «DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs». *Nucleic Acids Research* 32 (Web Server Issue): W113-W120). Además, será evidente para los expertos en la técnica que hay una serie de secuencias reguladoras (por ejemplo, promotores constitutivos o inducibles, promotores específicos del tejido o fragmentos funcionales de los mismos, etc.) que son útiles para el oligonucleótido antisentido, siRNA, o construcción de expresión de shRNA/vector.

Hay varios ejemplos en la técnica que describen modificaciones en el azúcar, base, fosfato y esqueleto que se pueden introducir en las moléculas de ácido nucleico con una mejora significativa de su estabilidad y eficacia ante las nucleasas. Por ejemplo, los oligonucleótidos se modifican para mejorar la estabilidad y/o mejorar la actividad biológica mediante la modificación con grupos resistentes a las nucleasas, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-H, modificaciones de las bases de los nucleótidos (para una revisión, véase Usman y Cedergren 1992 *TIBS*. 17: 34; Usman et al. 1994 *Nucleic. Acids Symp.* Ser. 31: 163; Burgin et al. 1996 *Biochemistry* 35: 14090). La modificación del azúcar de las moléculas de ácido nucleico se describe extensivamente en la técnica.

Se han descrito modificaciones y conjugaciones de agentes de RNAi adicionales. Soutschek et al. 2004 *Nature* 432: 173-178 presentaron la conjugación del colesterol al extremo en 3' de la hebra sentido de una molécula de siRNA por medio de un conector de pirrolidina, lo que generó un conjugado covalente e irreversible. También se pueden realizar modificaciones químicas (entre ellas la conjugación con otras moléculas) de los agentes de RNAi para mejorar el tiempo de retención farmacocinética y la eficacia *in vivo*.

El agente de RNAi del β -ENaC puede comprender al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-ua-3'), en donde la uridina es un nucleótido con modificación en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-ug-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con modificación en 2'; al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-ca-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido con modificación en 2'; y/o al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-uu-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido con modificación en 2'.

El agente de RNAi puede comprender una modificación en 2' seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE) y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).

Se describe que el RNAi comprende un hueco o le falta una base. Por ejemplo, el esqueleto de fosfato-azúcar puede estar presente, pero faltar la base.

Se describe que el agente de RNAi tiene una mella monocatenaria (p. ej., una rotura o ausencia de enlace en el esqueleto). En diferentes realizaciones, una mella monocatenaria puede estar en la hebra sentido o bien en la hebra antisentido, o en ambas.

Esta muesca puede estar, por ejemplo, en la hebra sentido, que produce un ARN interferente pequeño internamente segmentado o sisiRNA, que puede tener menos efectos inespecíficos que el correspondiente agente de RNAi sin una mella.

El ácido nucleico antisentido o agente de RNAi puede tener también un esqueleto alternativo, tal como los ácidos nucleicos bloqueados (LNA), morfolinos, ácidos peptidonucleicos (PNA), ácido nucleico de treosa (TNA) o ácido glicol nucleico (GNA) y/o puede estar marcado (p. ej., radiomarcado o, si no, etiquetado).

Una o ambas hebras pueden comprender un esqueleto alternativo.

Se describe que el agente de RNAi empleado por los métodos descritos puede incluir una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, al contrario que las unidades β habituales, las hebras corren paralelas la una a la otra. Gaultier et al. 1987 *Nucleic Acids. Res.* 15: 6625-6641.

- 5 La molécula de ácido nucleico antisentido puede también comprender un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et al. 1987 *Nucleic Acids Res.* 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. 1987 *FEBS Lett.* 215: 327-330).

- Se describe un agente de RNAi que es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el cual tiene una región complementaria. Así pues, las ribozimas [p. ej., ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff et al. 1988, *Nature* 334: 585-591)] se pueden utilizar para escindir catalíticamente los transcritos del ARNm del β -ENaC, mediante lo cual inhiben la traducción del ARNm del β -ENaC.
- 10

- Como alternativa, la expresión génica se puede inhibir al actuar selectivamente sobre las secuencias nucleotídicas complementarias a la región reguladora del β -ENaC (p. ej., el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen del β -ENaC. Véase, para una visión general, Helene 1991 *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84; Helene et al. 1992. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; y Maher 1992, *Bioassays* 14 (12): 807-15.
- 15

Producción de agentes de RNAi

- El agente de RNAi se puede producir biológicamente mediante un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (a saber, el ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado estará en una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés). El agente de RNAi también se puede producir biológicamente mediante un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico como una construcción de shRNA (a saber, el ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado tendrá una primera región en una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés, una segunda región que comprende un bucle o bisagra, y una tercera región en una orientación sentido con respecto al ácido nucleico diana de interés, en donde las primera y tercera regiones del transcrito se hibridan preferiblemente entre ellas, con lo que se forma una estructura de tallo y bucle).
- 20
- 25

Los métodos para producir los agentes de RNAi se conocen bien en la técnica y están disponibles para los expertos en la técnica.

- 30 Los kits para la síntesis de la RNAi están comercialmente disponibles de, p. ej., New England Biolabs y Ambion.

Administración de los agentes de RNAi

Los agentes de RNAi de la presente descripción se pueden administrar o introducir (p. ej., en una célula *in vitro*, en un animal problema, o en un humano) mediante los medios conocidos en la técnica.

- Los agentes de RNAi de la presente descripción se administran típicamente a un sujeto o se generan *in situ* de tal manera que se hibridan con el ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica el β -ENaC e inhiben la expresión al inhibir su transcripción y/o traducción. Un ejemplo de una vía de administración del agente de RNAi incluye una inyección directa en un sitio del tejido. Como alternativa, los agentes de RNAi se pueden modificar para que actúen selectivamente sobre determinadas células y a continuación administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido se pueden modificar de tal manera que se fijen de forma específica a los receptores o antígenos que se expresan en una superficie celular seleccionada, p. ej., mediante la conexión de las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores de la superficie celular o antígenos. Las moléculas del ácido nucleico antisentido se pueden administrar en las células con vectores bien conocidos en la técnica y que se describen en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º US20070111230. Para conseguir la concentración intracelular suficiente de las moléculas antisentido, se prefieren las construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte de pol II o pol III.
- 35
- 40
- 45

- «Introducir en una célula», cuando se refiere a un agente de RNAi, significa facilitar o efectuar la captación o absorción en la célula, como conocen los expertos en la técnica. La absorción o captación de un agente de RNAi se puede producir a través de procesos celulares de difusión activa o pasiva, o mediante agentes o dispositivos auxiliares. El significado de este término no se limita a las células *in vitro*; un agente de RNAi también se puede «introducir en una célula», en donde la célula es parte de un organismo vivo. En tal ejemplo, la introducción en la célula incluirá la administración en el organismo. Por ejemplo, para la administración *in vivo*, un agente de RNAi se puede inyectar en un sitio del tejido o se puede administrar sistémicamente. La administración *in vivo* también puede ser un sistema de administración de β -glucano, tales como los descritos en las patentes de los EE. UU. n.º 5.032.401 y 5.607.677, y la publicación de los EE. UU. n.º 2005/0281781. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica, tales como la electroporación y la lipofección. En la presente memoria se describen más estrategias o se conocen en la técnica.
- 50
- 55

La administración del agente de RNAi al tejido es un problema debido a que el material debe alcanzar el órgano diana y también porque debe entrar en el citoplasma de las células diana. El ARN no puede atravesar las membranas celulares, por lo que la administración sistémica del agente de RNAi desnudo es poco probable que resulte un éxito. El ARN se degrada rápidamente por la actividad RNasa en el suero. Por estas razones, se han contemplado otros mecanismos para administrar el agente de RNAi a las células diana. Los métodos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitarse a ellos: la introducción con virus (retrovirus, adenovirus, lentivirus, baculovirus, AAB); liposomas (Lipofectamina, DOTAP catiónico, DOPC neutro) o nanopartículas (polímero catiónico, PEI), introducción desde bacterias (tkRNAi) y también la modificación química (LNA) del siRNA para mejorar la estabilidad. Xia et al. 2002. *Nat. Biotechnol.* 20 y Devroe et al. 2002. *BMC Biotechnol.* 21: 15, describen la incorporación de siRNA en un vector vírico. Se contemplan otros sistemas para la administración de los agentes de RNAi y los agentes de RNAi de la presente descripción se pueden administrar mediante diferentes métodos aún por hallar y/o aprobar por la FDA u otras autoridades reguladoras. Los agentes de RNAi de la presente descripción se pueden administrar en una composición farmacéutica adecuada.

Composiciones farmacéuticas para los agentes de RNAi

15 Tal y como se utiliza aquí, una «composición farmacéutica» comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o varios agentes de RNAi del β -ENaC, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, facultativamente, un tratamiento adicional de la enfermedad que funciona en sinergia con el agente de RNAi. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «cantidad farmacológicamente eficaz», «cantidad terapéuticamente eficaz» o simplemente «cantidad eficaz» se refiere a la cantidad de agente de RNAi que es eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo pretendido. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando hay al menos una reducción del 10% en un parámetro medible asociado a una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 10% de ese parámetro. En esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de RNAi que actúa selectivamente sobre el β -ENaC puede reducir la cantidad de proteína del β -ENaC al menos un 10%. En realizaciones adicionales, un tratamiento clínico determinado se considera eficaz cuando hay al menos una reducción del 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de un parámetro medible asociado a una enfermedad o trastorno, y la cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%, respectivamente, de ese parámetro.

30 La terminología «vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico. Tales vehículos incluyen, pero sin limitarse a ellos, disolución salina, tampón salino, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. El término específicamente excluye el medio de cultivo celular. Para los fármacos administrados por vía oral, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a ellos, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son disgregantes adecuados. Los aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el lubricante, si está presente, será por lo general estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tubo digestivo. Los agentes incluidos en las formulaciones farmacológicas se describen con más detalle en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de RNAi del β -ENaC pueden estar en forma sólida, por ejemplo, polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas de gelatina, liposomas, supositorios, formas mascables o parches. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de RNAi del β -ENaC pueden también presentarse en forma líquida, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones, elixires o jarabes. Los soportes líquidos adecuados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos tales como poliol, tal como glicerol o glicoles, entre ellos propilenglicol y polietilenglicol, o etanol, Cremphor EL, o mezclas de los mismos, en proporciones diferentes, en agua. Las composiciones pueden comprender gránulos cristalinos o amorfos de un tamaño nanométrico revestidos con albúmina o un tensioactivo.

50 Los soportes apropiados pueden incluir, por ejemplo, agentes antibacterianos y antimicóticos, tamponantes, fosfato de calcio, celulosa, metilcelulosa, clorobutanol, mantequilla de cacao, colorantes, dextrina, emulsionantes, revestimientos entéricos, aromatizantes, gelatina, agentes isotónicos, lecitina, estearato de magnesio, perfumantes, polialcoholes tales como manitol, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, parabeno, ácido sórbico de fenol, polietilenglicol, polivinilpirrolidina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), conservantes, propilenglicol, 55 carboximetilcelulosa de sodio, cloruro de sodio, sorbitol, diferentes azúcares (entre ellos, pero sin limitarse a ellos, sacarosa, fructosa, galactosa, lactosa y trehalosa), almidón, cera para supositorios, talco, aceites vegetales, tal como aceite de oliva y aceite de semillas, vitaminas, cera y/o humectantes. Para los agentes de RNAi del β -ENaC, un soporte preferido comprende dextrano y agua, p. ej., dextrosa al 5% en agua (D5W).

La porción biológicamente inerte de la composición farmacéutica puede ser facultativamente erosionable, lo que permite una liberación del agente de RNAi espaciada en el tiempo.

La composición farmacéutica puede comprender otros componentes que ayudan en la administración, estabilidad, eficacia o reducción de la inmunogenia.

Composición farmacéutica que comprende un agente de RNAi del β -ENaC

5 Los componentes adicionales de una composición farmacéutica que comprende un agente de RNAi del β -ENaC se pueden añadir para ayudar a la administración, estabilidad, eficacia o reducción de la inmunogenia.

10 Los liposomas se han utilizado previamente para la administración del fármaco (p. ej., administración de un antineoplásico). Los liposomas (p. ej., liposomas catiónicos) se describen en las publicaciones PCT de patente internacional WO 02/100435A1, WO 03/015757A1 y WO 04029213A2; las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.962.016, 5.030.453 y 6.680.068; y la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2004/0208921. Un proceso para fabricar liposomas se describe también en la solicitud de patente internacional WO 04/002453A1. Además, se han incorporado lípidos neutros en los liposomas catiónicos (p. ej., Farhood et al., 1995).

Se han utilizado liposomas catiónicos para administrar el agente de RNAi a diferentes tipos de células (Sioud y Sorensen 2003; solicitud de patente de los EE. UU. 2004/0204377; Duxbury et al., 2004; Donze y Picard, 2002).

15 El uso de liposomas neutros se describe en Miller et al. 1998 y en la solicitud de patente de los EE. UU. 2003/0012812.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «SNALP» se refiere a una partícula lipídica estable con ácido nucleico. Un SNALP representa una vesícula de lípidos que reviste un interior acuoso reducido que comprende un ácido nucleico, tal como un iRNA o un plásmido, del cual se transcribe un iRNA. Los SNALP se describen, p. ej., en las publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. n.ºs 20060240093, 20070135372 y en la solicitud de patente internacional n.º WO 2009082817.

25 La transfección química mediante técnicas basadas en lípidos, basadas en polímeros y basadas en aminas, se describe en productos de Ambion Inc., Austin, Tex; y Novagen, EMD Biosciences, Inc., una empresa afiliada de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; Ovcharenko D. (2003) «Efficient delivery of siRNAs to human primary cells». *Ambion TechNotes* 10 (5): 15-16). Adicionalmente, Song et al. (*Nat. Med.* Publicado en línea (Fete 1 0, 2003) doi: 10.1038/nm828) y otros [Caplen et al. 2001 *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE. UU.), 98: 9742-9747; y McCaffrey et al. *Nature* 414: 34-39] describen que los hepatocitos se pueden transfectar con eficacia mediante la inyección del siRNA en el aparato circulatorio de un mamífero.

30 Se han utilizado una serie de moléculas para la administración específica de célula del agente de RNAi. Por ejemplo, la propiedad condensadora de ácidos nucleicos que tiene la protamina se ha combinado con anticuerpos específicos para administrar los siRNA. Song et al. 2005 *Nat. Biotech.* 23: 709-717. La polietilimina policatiónica PEGilada de autoensamblaje (PEI) también se ha utilizado para condensar y proteger los siRNA. Schifflers et al. 2004 *Nucl. Acids Res.* 32: e149, 141-1 10.

Las nanopartículas que contienen siRNA se administraron con éxito a continuación a una neovascularización tumoral que sobreexpresa integrinas. Hu-Lieskovan et al. 2005 *Cancer Res.* 65: 8984-8992.

35 Los agentes de RNAi de la presente descripción se pueden administrar a través, por ejemplo, de nanopartículas lipídicas (NPL); liposomas neutros (LN); nanopartículas de polímeros; motivos de fijación al ARN bicatenario (dsRBM, por su nombre en inglés); o a través de la modificación del agente de RNAi (p. ej., unión covalente al dsRNA).

40 Las nanopartículas lipídicas (NPL) son sistemas con lípidos catiónicos que se autoensamblan. Pueden comprender, por ejemplo, un lípido neutro (la base del liposoma); un lípido catiónico (para la carga del siRNA); colesterol (para estabilizar los liposomas); y lípidos PEGilados (para estabilizar la formulación, apantallar las cargas y prolongar la circulación en el torrente circulatorio).

45 El lípido catiónico puede comprender, por ejemplo, un grupo de cabeza, un conector, una cola y una cola de colesterol. El NPL puede tener, por ejemplo, buena administración al tumor, prolongada circulación en la sangre, partículas pequeñas (p. ej., menos de 100 nm) y estabilidad en el microentorno tumoral (que tiene un pH bajo y es hipóxico).

Los liposomas neutros (LN) son partículas con lípidos no catiónicos

Las nanopartículas de polímeros son partículas hechas de polímeros que se autoensamblan.

Los motivos de fijación al ARN bicatenario (dsRBM) son proteínas autoensamblantes de fijación al ARN, que necesitarán modificaciones.

50 El agente de RNAi del β -ENaC se puede ligar a uno o varios compuestos diagnósticos, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, resto que confiere resistencia a las nucleasas, nucleobase inusual o natural, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol, vitamina, glúcido, dextrano, pululano, quitina, quitosano, glúcido sintético,

oligolactato de 15 restos, polímero natural, polímero de masa molecular baja o media, inulina, ciclodextrina, ácido hialurónico, proteína, agente de fijación a proteínas, molécula de acción selectiva sobre la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitador peptídico y/o transferrina.

Los agentes de RNAi de la presente descripción se pueden preparar en una composición farmacéutica que comprende diferentes componentes adecuados para el método particular de administración del agente de RNAi.

Administración de un agente de RNAi

La composición farmacéutica que comprende un β -ENaC se puede administrar por las vías yugal, inhalación (que incluye la insuflación y la inhalación profunda), nasal, oral, parenteral, implante, inyección o infusión por vía epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardíaca, intracerebroventricular, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intaesternal, intratecal, intravenosa, subaracnoide, subcapsular, subcutánea, subcuticular, transendotelial, transtraqueal, transvascular, rectal, sublingual, tópica y/o vaginal. Esto puede ser mediante inyección, infusión, parche dérmico o cualquier otro método conocido en la técnica. La formulación puede ser en polvo, nebulizada, en aerosol, granulada o de cualquier otra manera que esté preparada adecuadamente para la administración. La administración, si es líquida, puede ser lenta o mediante bolo, aunque, en algunas circunstancias conocidas en la técnica, las inyecciones en embolada pueden conducir a la pérdida de material a través de los riñones.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de RNAi del β -ENaC se pueden administrar con los productos sanitarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización concreta, un agente de RNAi se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente descripción incluyen: la patente de los EE. UU. n.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; la patente de los EE. UU. n.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicaciones a través de la piel; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de la medicación para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua del fármaco; la patente de los EE. UU. n.º 4.439.196, que describe un sistema de administración osmótica del fármaco que tiene compartimentos con varias cámaras; y la patente de los EE. UU. n.º 4.475.196, que describe un sistema de administración osmótica del fármaco. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de RNAi se pueden formular para asegurar la distribución adecuada *in vivo*. La administración de un agente de RNAi del β -ENaC puede ser sistémica (todo el cuerpo) o, en particular, de acción selectiva sobre tejidos u órganos que expresan (o sobreexpresan o muestran su hiperactividad) el β -ENaC, tal como pulmón, riñón, colon y glándulas. Los métodos para actuar selectivamente sobre estos tejidos u órganos concretos se describen en la presente memoria y/o se conocen en la técnica. Por ejemplo, se pueden formular en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o varios restos que se transportan selectivamente al interior de células u órganos específicos; así pues, mejoran la administración dirigida del fármaco (véase, p. ej., V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685).

Los restos direccionantes de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de la proteína tensioactiva A (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134), diferentes especies las cuales pueden comprender las formulaciones de las presentes descripciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o varios agentes de RNAi del β -ENaC, que pueden facultativamente comprender diferentes modificaciones y/o componentes adicionales, para el uso en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC.

50 Enfermedades relacionadas con el β -ENaC

La presente descripción abarca los agentes de RNAi específicos del β -ENaC.

Con «enfermedad relacionada con el β -ENaC» se quiere hacer referencia a cualquier enfermedad relacionada con una disfunción del nivel, de la expresión y/o de la actividad del β -ENaC y/o de cualquier enfermedad que se puede tratar y/o mejorar mediante la modulación del nivel, de la expresión y/o de la actividad del β -ENaC. En concreto, incluye fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasemia e hipertensión asociada a la obesidad.

Con «fibrosis quística» o «FQ» se quiere hacer referencia a la enfermedad hereditaria corriente asociada a

mutaciones en el gen del regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR, por su nombre en inglés). El CFTR codifica un canal de Cl^- dependiente de AMPc y regula el ENaC. En los epitelios de las vías aéreas cuando hay FQ, la secreción de Cl^- mediada por el CFTR es defectuosa y la absorción de Na^+ mediada por el ENaC está incrementada. Estos defectos del transporte de iones en las vías aéreas cuando hay FQ provocan la pérdida de volumen del líquido superficial de las vías aéreas (LSVA), eliminación defectuosa de la mucosidad y adhesión de la mucosidad, lo que sugiere que la pérdida de volumen del LSVA es un mecanismo clave para la patogenia de la enfermedad pulmonar de la FQ. En los ratones experimentales, la sobreexpresión específica de las vías aéreas del β -ENaC demuestra que la aceleración del transporte de Na^+ por sí sola es suficiente para producir la pérdida de volumen del LSVA y la enfermedad pulmonar de tipo FQ, que incluye la obstrucción de las vías aéreas con mucosidad, metaplasia de las células caliciformes, inflamación neutrófila crónica de las vías aéreas, deterioro de la eliminación de los patógenos bacterianos y, finalmente, mortalidad. Véase Zhou et al. 2008 y las referencias citadas en éste.

Con «síndrome de Liddle» se quiere hacer referencia a una forma hereditaria de hipertensión que es autosómica y dominante, caracterizada por una hipertensión precoz e intensa, a menudo acompañada de alcalosis metabólica e hipopotasemia, en donde todos ellos son signos característicos de un exceso de aldosterona (síndrome de Conn).

La concentración de la aldosterona en el plasma es, sin embargo, baja. Así pues, el síndrome de Liddle se llama también pseudoaldosteronismo. Esta forma intensa de hipertensión responde al tratamiento con una dieta baja en sales e inhibidores del canal de Na^+ (diuréticos ahorradores de K^+), lo que sugiere una regulación defectuosa primaria del ENaC. La enfermedad está relacionada con mutaciones del γ -ENaC y también varias mutaciones del β -ENaC (P615S, P616L e Y618H en el motivo «PY» que tiene una secuencia consenso PPXY; y también R564st, W574st, 579 Δ 32, Q589st, T592fr, A593fr y R595fr, en donde «fr» es un cambio de fase, « Δ » es una deleción y «st» es un codón de parada prematuro).

Estas mutaciones ocasionan una sobreexpresión de los canales de Na^+ que son hiperactivos en comparación con el ENaC de tipo silvestre. Las mutaciones también impiden que disminuya la expresión del canal que normalmente se produce cuando aumenta el Na^+ intracelular; los canales de ENaC con la mutación de Liddle permanecen en un estado muy activo a pesar de la elevada concentración de Na^+ intracelular. Así pues, el nivel y/o la actividad de un ENaC mutado con el síndrome de Liddle puede modularse mediante un siRNA específico del β -ENaC, o un tal siRNA en combinación con tratamientos conocidos del síndrome de Liddle, tal como una dieta baja en sales e inhibidores del canal de Na^+ (diuréticos ahorradores de K^+).

Para más información sobre las enfermedades relacionadas con el β -ENaC, véase, por ejemplo, Hummler et al. 1999. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: 567-571.

Con «hipertensión asociada a la obesidad» se quiere hacer referencia a la hipertensión relacionada o asociada a la obesidad y similares. La obesidad está asociada a la hipertensión. Se han propuesto muchos mecanismos para explicar esta correlación, entre ellos (en el obeso) incremento de la actividad simpática; incremento de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona; incremento del gasto cardíaco; e incremento de la presión mecánica de la grasa intersticial que rodea los órganos, hiperinsulinemia; y/o resistencia a la insulina. La retención de sodio en el riñón podría ser resultado de cualquiera de estos mecanismos. La reabsorción del sodio se produce a través del ENaC en el túbulo conector y en el conducto colector. La cantidad de β -ENaC se incrementó en el riñón de las ratas Zucker (un modelo animal de obesidad).

Bickel et al. 2001 *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281: 639-648. El incremento relativo de la abundancia de este y otros transportadores del sodio, sin que disminuyan los otros transportadores del sodio, probablemente da lugar a una mejora de la reabsorción tubular del sodio. Como resultado, estas alteraciones de la abundancia del transportador renal del sodio podría ser importante para el desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión arterial en los mamíferos obesos, entre ellos los humanos.

Con «pseudohipoaldosteronismo de tipo 1», «PHA1», «PHA-1» y similares se quiere hacer referencia a un síndrome clínico heterólogo que se caracteriza por la resistencia final del órgano a los mineralocorticoides, a saber, la pérdida de Na^+ por la orina y la reducción de la excreción de K^+ a pesar de que la concentración de aldosterona sea alta. Una forma intensa de este síndrome se hereda como un rasgo recesivo autosómico, lo que da lugar a veces a episodios letales de hiponatremia, hipotensión e hiperpotasiemia, y muestra la alteración del transporte de Na^+ en varios órganos, riñón, glándulas salivales, glándulas sudoríparas y colon. En varias familias que muestran esta forma de PHA-1 se han hallado conexiones con las mutaciones en cualquiera de las tres subunidades del ENaC (entre ellas G37S en el β -ENaC).

Una forma menos grave de PHA-1 con un modo dominante autosómico de herencia es principalmente sintomático durante la infancia y mejora con la edad. Véase Hummler et al., 1999. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: 567-571.

Los agentes de RNAi del β -ENaC se pueden utilizar para tratar las enfermedades relacionadas con el β -ENaC, en concreto las enfermedades asociadas a la alteración de la expresión, actividad y/o niveles del β -ENaC.

Uso de los agentes de RNAi para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC

Los agentes de RNAi del β -ENaC descritos en la presente memoria se pueden formular en las composiciones farmacéuticas que se pueden administrar a los humanos o los animales no humanos. Estas composiciones pueden comprender uno o varios agentes de RNAi y, facultativamente, otros tratamientos útiles para tratar las enfermedades relacionadas con el β -ENaC. Se pueden administrar como parte de un tratamiento precoz o preventivo, y se pueden administrar en una dosis terapéuticamente eficaz. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéutico y se puede administrar mediante cualquier método conocido en la técnica. Estos diferentes aspectos de la presente descripción se describen con más detalle a continuación.

Los agentes de RNAi del β -ENaC se pueden administrar a los humanos y a los animales no humanos para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC.

- 10 Las composiciones que comprenden un agente de RNAi del β -ENaC se pueden administrar a los animales no humanos. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar a pollos, pavos, ganado (tales como ovejas, cerdos, caballos, ganado vacuno, etc.), mascotas (p. ej., gatos y perros) y pueden ser eficaces para el tratamiento de la fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasemia e hipertensión asociada a la obesidad, y enfermedades similares. En cada caso, el agente de RNAi del β -ENaC se seleccionaría para que coincida con la secuencia del β -ENaC del genoma del animal y para, en concreto, que contenga al menos una discordancia de 1 nt con todos los demás genes del genoma del animal. Los agentes de RNAi de la presente descripción pueden, así pues, utilizarse para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC en los humanos y en los animales no humanos.

- 20 Tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de la expresión del β -ENaC, los términos «tratar», «tratamiento» y similares se refieren a la mitigación o el alivio de los procesos patológicos en los que interviene la expresión del β -ENaC. En el contexto de la presente descripción, hasta donde se refiere a cualquiera de las otras afecciones que se enumeran en la presente memoria a continuación (diferentes a los procesos patológicos en los que interviene la expresión de β -ENaC), los términos «tratar» «tratamiento» y similares significan mitigar o aliviar al menos un síntoma asociado a tal afección, o enlentecer o revertir la progresión o la progresión anticipada de tal afección, tal como enlentecer la progresión de una dislipidemia, tal como la aterosclerosis.

- Con «tratamiento» se quiere hacer referencia a la prevención, tratamiento, cura o cualquier otro cambio de la enfermedad del paciente que indique una mejora del estado físico, o que no se degrada el mismo. Con «tratamiento» se hace referencia al tratamiento de la enfermedad relacionada con el β -ENaC (p. ej., fibrosis quística, pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasemia e hipertensión asociada a la obesidad) o cualquier tratamiento adecuado de cualquier otro padecimiento que tenga el paciente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «tratamiento» y «tratar» se refieren a un tratamiento profiláctico y preventivo, así como a un tratamiento modificador de la enfermedad o curativo, que incluye el tratamiento de los pacientes en riesgo de contraer una enfermedad o que se sospecha que tienen una enfermedad, al igual que los pacientes ya enfermos o a los que se ha diagnosticado que padecen tal afección. Los términos «tratamiento» y «tratar» también se refieren al mantenimiento y/o promoción de la salud de un individuo que no padece una enfermedad, pero que puede ser propenso de desarrollar una afección perjudicial, tal como el desequilibrio de nitrógeno o la pérdida muscular. En una realización, «tratamiento» no comprende la prevención de un estado patológico. Así pues, la presente descripción es útil para suprimir la expresión del gen del β -ENaC y/o tratar una enfermedad relacionada con el β -ENaC en un individuo que padece una enfermedad relacionada con el β -ENaC, o un individuo propenso a una enfermedad relacionada con el β -ENaC. Un individuo «afectado» por una enfermedad relacionada con el β -ENaC ha mostrado síntomas detectables que son característicos de la enfermedad o, si no, se ha mostrado clínicamente que ha estado expuesto o lleva patógenos o marcadores de la enfermedad relacionada con el β -ENaC. Como ejemplos no limitantes, un individuo afectado por una enfermedad relacionada con el β -ENaC puede mostrar síntomas externos; o puede no mostrar ningún síntoma externo, pero que se pueden demostrar con una análisis clínico que lleva en la sangre marcadores proteicos asociados a una enfermedad relacionada con el β -ENaC, o proteínas o material genético asociado a un patógeno.

- El tratamiento precoz de algunas enfermedades relacionadas con el β -ENaC puede ser más eficaz si se administra pronto en vez de tarde. La administración precoz preventiva de amilorida (un inhibidor del ENaC) fue útil para el tratamiento de los ratones modelo de FQ, mientras que la administración tardía no lo fue. De igual forma, la intervención precoz con los agentes antimicrobianos en la FQ era más eficaz que el tratamiento después de que se estableciese la infección. Zhou et al. 2008. Así pues, en una realización concreta, el agente de RNAi del β -ENaC se administró pronto, antes de que se manifestase la enfermedad y/o como un agente preventivo, en vez de administrarse después del establecimiento de la enfermedad.

- Los tratamientos de las enfermedades relacionadas con el β -ENaC pueden comprender diferentes tratamientos, que comprenden un agente de RNAi del β -ENaC y, facultativamente, comprende además un tratamiento adicional, que puede ser un método (o procedimiento) o una composición adicional (p. ej., un agente o agente de RNAi adicional).

Dosis y cantidades eficaces de los agentes de RNAi

Los agentes de RNAi de la presente descripción se administran en una dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que lo necesita.

Una «cantidad eficaz» o una «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad que trata una enfermedad o afección médica de un individuo o, de forma más general, proporciona un beneficio nutritivo, fisiológico o médico a un individuo. Tal y como se usa en la presente memoria, las frases «cantidad terapéuticamente eficaz» y «cantidad profilácticamente eficaz» se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento, 5 prevención o manejo de procesos patológicos mediados por la expresión del β -ENaC, o de un síntoma evidente de procesos patológicos mediados por la expresión del β -ENaC. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz puede ser determinada con facilidad por un médico corriente y puede variar según los factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de procesos patológicos mediados por la expresión del β -ENaC, los antecedentes y edad del paciente, la etapa de los procesos patológicos mediados por la expresión del β -ENaC y la 10 administración de otros agentes que inhiben los procesos patológicos mediados por la expresión del β -ENaC.

El paciente puede tener al menos aproximadamente 1, 3, 6 o 9 meses de edad, o 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 años de edad. El paciente puede no tener más de aproximadamente 1, 3, 6, o 9 meses de edad, o 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 o 100 años de edad. El paciente puede tener una masa corporal de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 15 300, 320, 340, 360, 380 o 400 libras. El paciente puede tener una masa corporal de no más de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 o 400 libras.

La dosis [medido solo el ingrediente o ingredientes activos] puede ser al menos aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 ng, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 1000 μ g, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 mg. La dosis no puede ser de más de aproximadamente 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 mg. La dosis se puede administrar al menos más de una vez al día, diariamente, más de una vez a la semana, 20 semanalmente, cada dos semanas, mensualmente y/o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o una combinación de las mismas.

La dosis se puede correlacionar con la masa corporal o el área de superficie corporal del individuo. El nivel de dosis real puede variarse para obtener una cantidad del agente activo que es eficaz para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin ser tóxico para el paciente. La dosis seleccionada dependerá de una serie de factores farmacocinéticos, entre ellos la actividad del agente de RNAi concreto empleado, la vía de administración, la 30 velocidad de excreción del agente de RNAi, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el agente de RNAi, la edad, sexo, peso, afección, salud general y antecedentes médicos del paciente, así como factores bien conocidos en la práctica médica. Un médico o veterinario que tiene una pericia normal en su práctica puede determinar con facilidad la cantidad eficaz del agente de RNAi que se necesita. Una dosis idónea será la cantidad que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico, o 35 una dosis lo suficientemente baja para producir un efecto terapéutico sin ocasionar efectos secundarios.

Además de una dosis terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de RNAi del β -ENaC, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender o ser utilizadas junto con un tratamiento adicional de la enfermedad que funciona en sinergia con el agente de RNAi. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender un antagonista adicional del ENaC, tales como diuréticos ahorradores de potasio, amilorida o 40 triamtereno. Se pueden administrar otros tratamientos junto con la composición farmacéutica, entre ellos, como ejemplo no limitante, la regulación de la ingesta de sal con la dieta. Cuando se utiliza para tratar la fibrosis quística, la composición farmacéutica se puede utilizar junto con varios fármacos y tratamientos conocidos en la técnica, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, antibióticos, tratamiento con ADNasa, albutrol, *N*-acetilcisteína, terapia respiratoria, terapia percutánea, ejercicio aeróbico y diferentes medicamentos y tratamientos para tratar padecimientos asociados 45 a la fibrosis quística (p. ej., diarrea, osteoporosis, diabetes, hemorragia, etc.).

Descripciones adicionales de los agentes de RNAi específicos del β -ENaC

La presente descripción comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido según se define en las reivindicaciones adjuntas.

El agente de RNAi del β -ENaC no comprende una secuencia de cualquier agente de RNAi del β -ENaC descrito en la 50 bibliografía de patentes y científica, p. ej., solicitud de patente de los EE. UU. n.º 60/346.069 (PCT/US02/41850) y Hyde et al. 2009, The 23rd North American Cystic Fibrosis Conference, Mineápolis, 14-17 de octubre de 2009; o la disponible como sc-42418 (y productos relacionados) de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.

Realizaciones específicas de los agentes de RNAi específicos del β -ENaC

En la presente memoria se describen diferentes realizaciones específicas de un agente de RNAi del β -ENaC.

55 En la presente memoria se define una discordancia como una diferencia entre la secuencia de las bases o su longitud cuando dos secuencias están alineadas al máximo y se comparan. Una discordancia se define como una posición donde la base de una secuencia no coincide con la base de la otra secuencia. Así, se cuenta una discordancia si, por ejemplo, una posición en una secuencia tiene una base concreta (p. ej., A) y la correspondiente

posición en la otra secuencia tiene una base diferente (p. ej., G).

- También cuenta como discordancia, p. ej., si una posición en una secuencia tiene una base (p. ej., A) y la posición correspondiente en la otra secuencia no tiene ninguna base (p. ej., esa posición es un nucleótido abásico que comprende un esqueleto de fosfato-azúcar, pero sin ninguna base). Una mella monocatenaria en cualquier
- 5 secuencia (o en la hebra sentido o antisentido) no se cuenta como discordancia. Así pues, como ejemplo no limitante, no se contaría ninguna discordancia si una secuencia comprende la secuencia AG, pero la otra secuencia comprende la secuencia AG con una mella monocatenaria entre la A y la G. Una modificación de base tampoco se considera una discordancia. Así pues, si una secuencia comprende una C y la otra secuencia comprende una C modificada (p. ej., modificación en 2') en la misma posición, no se contaría ninguna discordancia.
- 10 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20807 (SEQ ID n.^{os} 5 y 6, o las SEQ ID n.^{os} 115 y 116).
- Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20807.
- 15 Se describe que el siRNA comprende AD-20807.
- Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20807.
- Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20826 (SEQ ID n.^{os} 43 y 44, o las SEQ ID n.^{os} 153 y 154).
- 20 Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20826.
- Se describe que el siRNA comprende AD-20826.
- Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20826.
- Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832, que comprende las SEQ ID n.^{os} 55 y 56, o las SEQ ID n.^{os} 165 y 166.
- 25 Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20832.
- Se describe que el siRNA comprende AD-20832.
- 30 Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20832.
- En una realización concreta, la presente descripción comprende un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de: AD-20834, que comprende las SEQ ID n.^{os} 169 y 170.
- Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15
- 35 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20834.
- Se describe que el siRNA comprende AD-20834.
- Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20834.
- Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20848, que comprende las SEQ ID n.^{os} 87 y 88, o las SEQ ID n.^{os} 197 y 198.
- 40 Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20848.
- Se describe que el siRNA comprende AD-20848.
- Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20848.
- 45 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20861, que comprende las SEQ ID n.^{os} 97 y 98, o las SEQ ID n.^{os} 207 y 208).

Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la cadena sentido de AD-20861.

Se describe que el siRNA comprende AD-20861.

Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20861.

- 5 Se describe un agente de RNAi que muestra una reducción de aproximadamente al menos el 80% (actividad génica residual de no más de aproximadamente el 20%) de la expresión del gen del β -ENaC a una concentración *in vitro* de 10 nM en las células H441.

Así pues, se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; o AD-20834.

Se describe que el agente de RNAi también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; o AD-20834.

15 Se describe que el siRNA comprende AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; o AD-20834.

Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; o AD-20834.

- 20 Se describe un agente de RNAi que muestra una reducción de aproximadamente al menos el 70% (actividad génica residual de no más de aproximadamente el 30%) de la expresión del gen del β -ENaC a una concentración *in vitro* de 10 nM en las células H441.

Así pues, se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; o AD-20867.

- 25 Se describe que el agente de RNAi también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; o AD-20867.

30 Se describe que el siRNA comprende AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; o AD-20867.

Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; o AD-20867.

- 35 Se describe un agente de RNAi que muestra una reducción de aproximadamente al menos el 60% (actividad génica residual de no más de aproximadamente el 40%) de la expresión del gen del β -ENaC a una concentración *in vitro* de 10 nM en las células H441.

40 Así pues, se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; o AD-20827.

El agente de RNAi también puede comprender adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; o AD-20827.

- 45 El siRNA puede comprender AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; o AD-20827.

50 El siRNA puede tener una secuencia que consiste en la de AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; o AD-20827.

Se describe un agente de RNAi que muestra una reducción de aproximadamente al menos el 50% (actividad génica

residual de no más de aproximadamente el 50%) de la expresión del gen del β -ENaC a una concentración *in vitro* de 10 nM en las células H441.

5 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836; o AD-20822.

10 Se describe que el siRNA también comprende adicionalmente una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido de: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836; o AD-20822.

15 Se describe que el siRNA comprende AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836; o AD-20822.

Se describe que el siRNA tiene una secuencia que consiste en la de AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836; o AD-20822.

20 Diferentes realizaciones de un agente de RNAi del β -ENaC

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20805.

25 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20806.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20807.

30 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20808.

35 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20809.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20810.

40 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20811.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20812.

45 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20813.

50 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20814.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido y/o una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de AD-20815.

AD-20846, que comprende las SEQ ID n.^{os} 193 y 194.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20847, que comprende las SEQ ID n.^{os} 195 y 196.

- 5 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20848, que comprende las SEQ ID n.^{os} 197 y 198.

- 10 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20849, que comprende las SEQ ID n.^{os} 199 y 200.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20850, que comprende las SEQ ID n.^{os} 201 y 202.

- 15 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20851, que comprende las SEQ ID n.^{os} 203 y 204.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20852, que comprende las SEQ ID n.^{os} 205 y 206.

- 20 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20861, que comprende las SEQ ID n.^{os} 207 y 208.

- 25 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20862, que comprende las SEQ ID n.^{os} 209 y 210.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20863, que comprende las SEQ ID n.^{os} 211 y 212.

- 30 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20864, que comprende las SEQ ID n.^{os} 213 y 214.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20865, que comprende las SEQ ID n.^{os} 215 y 216.

- 35 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20866, que comprende las SEQ ID n.^{os} 217 y 218.

- 40 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0 nucleótidos de la hebra antisentido de: AD-20867, que comprende las SEQ ID n.^{os} 219 y 220.

Diferentes realizaciones de un agente de RNAi del β -ENaC

Se describe un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20805, que comprende las SEQ ID n.^{os} 1 y 2.

- 45 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20806, que comprende las SEQ ID n.^{os} 3 y 4.

- 50 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20807, que comprende las SEQ ID n.^{os} 5 y 6.

Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20849, que comprende las SEQ ID n.^{os} 89 y 90.

- 5 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20850, que comprende las SEQ ID n.^{os} 91 y 92.

- 10 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20851, que comprende las SEQ ID n.^{os} 93 y 94.

- 15 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20852, que comprende las SEQ ID n.^{os} 95 y 96.

- 20 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20861, que comprende las SEQ ID n.^{os} 97 y 98.

Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20862, que comprende las SEQ ID n.^{os} 99 y 100.

- 25 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20863, que comprende las SEQ ID n.^{os} 101 y 102.

- 30 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20864, que comprende las SEQ ID n.^{os} 103 y 104.

- 35 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20865, que comprende las SEQ ID n.^{os} 105 y 106.

- 40 Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20866, que comprende las SEQ ID n.^{os} 107 y 108.

Se describe la composición que comprende una variante modificada de un agente de RNAi, en donde la variante comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia antisentido de: AD-20867, que comprende las SEQ ID n.^{os} 109 y 110.

- 45 Diferentes descripciones de un agente de RNAi del β -ENaC

Se describe AD-20805 (SEQ ID n.^{os} 1 y 2, o SEQ ID n.^{os} 111 y 112).

Se describe AD-20806 (SEQ ID n.^{os} 3 y 4, o SEQ ID n.^{os} 113 y 114).

Se describe AD-20807 (SEQ ID n.^{os} 5 y 6, o SEQ ID n.^{os} 115 y 116).

Se describe AD-20808 (SEQ ID n.^{os} 7 y 8, o SEQ ID n.^{os} 117 y 118).

- 50 Se describe AD-20809 (SEQ ID n.^{os} 9 y 10, o SEQ ID n.^{os} 119 y 120).

Se describe AD-20810 (SEQ ID n.^{os} 11 y 12, o SEQ ID n.^{os} 121 y 122).

- Se describe AD-20811 (SEQ ID n.^{os} 13 y 14, o SEQ ID n.^{os} 123 y 124).
- Se describe AD-20812 (SEQ ID n.^{os} 15 y 16, o SEQ ID n.^{os} 125 y 126).
- Se describe AD-20813 (SEQ ID n.^{os} 17 y 18, o SEQ ID n.^{os} 127 y 128).
- Se describe AD-20814 (SEQ ID n.^{os} 19 y 20, o SEQ ID n.^{os} 129 y 130).
- 5 Se describe AD-20815 (SEQ ID n.^{os} 21 y 22, o SEQ ID n.^{os} 131 y 132).
- Se describe AD-20816 (SEQ ID n.^{os} 23 y 24, o SEQ ID n.^{os} 133 y 134).
- Se describe AD-20817 (SEQ ID n.^{os} 25 y 26, o SEQ ID n.^{os} 135 y 136).
- Se describe AD-20818 (SEQ ID n.^{os} 27 y 28, o SEQ ID n.^{os} 137 y 138).
- Se describe AD-20819 (SEQ ID n.^{os} 29 y 30, o SEQ ID n.^{os} 139 y 140).
- 10 Se describe AD-20820 (SEQ ID n.^{os} 31 y 32, o SEQ ID n.^{os} 141 y 142).
- Se describe AD-20821 (SEQ ID n.^{os} 33 y 34, o SEQ ID n.^{os} 143 y 144).
- Se describe AD-20822 (SEQ ID n.^{os} 35 y 36, o SEQ ID n.^{os} 145 y 146).
- Se describe AD-20823 (SEQ ID n.^{os} 37 y 38, o SEQ ID n.^{os} 147 y 148).
- Se describe AD-20824 (SEQ ID n.^{os} 39 y 40, o SEQ ID n.^{os} 149 y 150).
- 15 Se describe AD-20825 (SEQ ID n.^{os} 41 y 42, o SEQ ID n.^{os} 151 y 152).
- Se describe AD-20826 (SEQ ID n.^{os} 43 y 44, o SEQ ID n.^{os} 153 y 154).
- Se describe AD-20827 (SEQ ID n.^{os} 45 y 46, o SEQ ID n.^{os} 155 y 156).
- Se describe AD-20828 (SEQ ID n.^{os} 47 y 48, o SEQ ID n.^{os} 157 y 158).
- Se describe AD-20829 (SEQ ID n.^{os} 49 y 50, o SEQ ID n.^{os} 159 y 160).
- 20 Se describe AD-20830 (SEQ ID n.^{os} 51 y 52, o SEQ ID n.^{os} 161 y 162).
- Se describe AD-20831 (SEQ ID n.^{os} 53 y 54, o SEQ ID n.^{os} 163 y 164).
- Se describe AD-20832 (SEQ ID n.^{os} 55 y 56, o SEQ ID n.^{os} 165 y 166).
- Se describe AD-20833 (SEQ ID n.^{os} 57 y 58, o SEQ ID n.^{os} 167 y 168).
- Se describe AD-20834 (SEQ ID n.^{os} 59 y 60, o SEQ ID n.^{os} 169 y 170).
- 25 Se describe AD-20835 (SEQ ID n.^{os} 61 y 62, o SEQ ID n.^{os} 171 y 172).
- Se describe AD-20836 (SEQ ID n.^{os} 63 y 64, o SEQ ID n.^{os} 173 y 174).
- Se describe AD-20837 (SEQ ID n.^{os} 65 y 66, o SEQ ID n.^{os} 175 y 176).
- Se describe AD-20838 (SEQ ID n.^{os} 67 y 68, o SEQ ID n.^{os} 177 y 178).
- Se describe AD-20839 (SEQ ID n.^{os} 69 y 70, o SEQ ID n.^{os} 179 y 180).
- 30 Se describe AD-20840 (SEQ ID n.^{os} 71 y 72, o SEQ ID n.^{os} 181 y 182).
- Se describe AD-20841 (SEQ ID n.^{os} 73 y 74, o SEQ ID n.^{os} 183 y 184).
- Se describe AD-20842 (SEQ ID n.^{os} 75 y 76, o SEQ ID n.^{os} 185 y 186).
- Se describe AD-20843 (SEQ ID n.^{os} 77 y 78, o SEQ ID n.^{os} 187 y 188).
- Se describe AD-20844 (SEQ ID n.^{os} 79 y 80, o SEQ ID n.^{os} 189 y 190).
- 35 Se describe AD-20845 (SEQ ID n.^{os} 81 y 82, o SEQ ID n.^{os} 191 y 192).
- Se describe AD-20846 (SEQ ID n.^{os} 83 y 84, o SEQ ID n.^{os} 193 y 194).
- Se describe AD-20847 (SEQ ID n.^{os} 85 y 86, o SEQ ID n.^{os} 195 y 196).

- Se describe AD-20848 (SEQ ID n.^{os} 87 y 88, o SEQ ID n.^{os} 197 y 198).
- Se describe AD-20849 (SEQ ID n.^{os} 89 y 90, o SEQ ID n.^{os} 199 y 200).
- Se describe AD-20850 (SEQ ID n.^{os} 91 y 92, o SEQ ID n.^{os} 201 y 202).
- Se describe AD-20851 (SEQ ID n.^{os} 93 y 94, o SEQ ID n.^{os} 203 y 204).
- 5 Se describe AD-20852 (SEQ ID n.^{os} 95 y 96, o SEQ ID n.^{os} 205 y 206).
- Se describe AD-20861 (SEQ ID n.^{os} 97 y 98, o SEQ ID n.^{os} 207 y 208).
- Se describe AD-20862 (SEQ ID n.^{os} 99 y 100, o SEQ ID n.^{os} 209 y 210).
- Se describe AD-20863 (SEQ ID n.^{os} 101 y 102, o SEQ ID n.^{os} 211 y 212).
- Se describe AD-20864 (SEQ ID n.^{os} 103 y 104, o SEQ ID n.^{os} 213 y 214).
- 10 Se describe AD-20865 (SEQ ID n.^{os} 105 y 106, o SEQ ID n.^{os} 215 y 216).
- Se describe AD-20866 (SEQ ID n.^{os} 107 y 108, o SEQ ID n.^{os} 217 y 218).
- Se describe AD-20867 (SEQ ID n.^{os} 109 y 110, o SEQ ID n.^{os} 219 y 220).
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20805.
- 15 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20806.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20807.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20808.
- 20 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20809.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20810.
- 25 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20811.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20812.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20813.
- 30 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20814.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20815.
- 35 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20816.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20817.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20818.
- 40 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20819.
- Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20820.

y longitud que la hebra antisentido de AD-20844.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20845.

5 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20846.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20847.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20848.

10 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20849.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20850.

15 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20851.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20852.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20861.

20 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20862.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20863.

25 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20864.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20865.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20866.

30 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que la hebra antisentido de AD-20867.

35 En estas distintas realizaciones, un agente de RNAi que comprende una hebra antisentido que tiene exactamente las mismas secuencia y longitud que una hebra antisentido enumerada de un agente de RNAi enumerado puede comprender nucleótidos modificados, caperuzas en los extremos 3', y/u otras modificaciones que no alteran ni la secuencia ni la longitud del agente de RNAi.

Diferentes realizaciones de un agente de RNAi del β -ENaC

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20805.

40 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20806.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20807.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20808.

45 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20809.

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3

discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20862, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

5 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20863, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20864, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

10 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20865, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20866, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

15 Se describe que el agente de RNAi comprende una hebra antisentido que consiste en una secuencia con 0, 1, 2 o 3 discordancias con respecto a la de la hebra antisentido de AD-20867, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nt (o cualquier margen de los mismos).

Otras descripciones específicas particulares

20 En diferentes realizaciones, un agente de RNAi comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria.

Así pues, en diferentes descripciones:

25 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de uno cualquiera o varios de las siguientes dobles hebras, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos.

Otras descripciones específicas particulares

35 Se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras, en donde la secuencia de la primera hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2, o 3 nt de la secuencia de la primera hebra, y la secuencia de la segunda hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia de la segunda hebra, de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria.

Así pues, en diferentes descripciones:

40 Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la secuencia de la primera hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la secuencia de la primera hebra, y la secuencia de la segunda hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia de la segunda hebra, de uno cualquiera o varios de las siguientes dobles hebras, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos.

50 Otras descripciones particulares

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende o consiste en la hebra antisentido de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria.

Así pues, se dan a conocer los siguientes a modo de ejemplos:

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende o consiste en la hebra antisentido de: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos.

Se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nt (o cualquier margen de los mismos, p. ej., 0-1, 1-2, 1-3, 1-4, etc.).

Así pues, se describe un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido de: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos, en donde la hebra antisentido comprende además de forma optativa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nt (o cualquier margen de los mismos, p. ej., 0-1, 1-2, 1-3, 1-4, etc.).

Se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras, en donde la secuencia de la primera hebra comprende o consiste en la secuencia de la primera hebra, y la secuencia de la segunda hebra comprende o consiste en la secuencia de la segunda hebra, de cualquier agente de RNAi descrito en la presente memoria, o variantes modificadas o sin modificar de los mismos.

Así pues, se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras, en donde la secuencia de la primera hebra comprende o consiste en la secuencia de la primera hebra, y la secuencia de la segunda hebra comprende o consiste en la secuencia de la segunda hebra, de: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867.

Se describe uno o varios agentes de RNAi recogidos en la presente memoria.

Conjuntos solapantes de agentes de RNAi del β -ENaC

Se describen grupos de agentes de RNAi específicos del β -ENaC con secuencias solapantes. Así pues, se describen grupos de agentes de RNAi en los que cada agente de RNAi del grupo se solapa con cada uno de los demás agentes de RNAi del mismo grupo en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más nucleótidos. En particular, se describe que el solapamiento es de al menos 12 nt.

Algunos de los agentes de RNAi recogidos en la presente memoria tienen secuencias que se solapan entre sí. La tabla 2 presenta una compilación de algunos de estos grupos solapantes de agentes de RNAi, en donde cada miembro de un grupos se solapa con los demás miembros del mismo grupo en al menos 12 nt. Se presenta una porción de 12 nt del solapamiento de las hebras sentido y antisentido.

Así pues, por ejemplo, tal y como se muestra en la tabla 2, se solapan las secuencias de los agentes de RNAi AD-20807 y AD-20832, en donde el solapamiento de la hebra sentido comprende la secuencia UGAAGAAGUACC (SEQ ID n.º 223); estos agentes de RNAi también se solapan en la secuencia de la hebra antisentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia GGUACUUCUUCA (SEQ ID n.º 224). Los agentes de RNAi AD-20807, AD-20862 y AD-20832 se solapan en la hebra sentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia GAAGAAGUACCU (SEQ ID n.º 225); estos agentes de RNAi también se solapan en la hebra antisentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia AGGUACUUCUUC (SEQ ID n.º 226). Así pues, estos y otros conjuntos diferentes de agentes de RNAi solapantes presentados en la tabla 2 comparten peculiaridades técnicas comunes, por ejemplo, el solapamiento en la hebra sentido y en la hebra antisentido.

En la tabla 2 que viene a continuación se dan a conocer conjuntos concretos de agentes de RNAi del β -ENaC que son solapantes.

Así pues, se describe cualquier grupo o subgrupo de agentes de RNAi que comprenden una peculiaridad técnica común, en donde la peculiaridad técnica común es un solapamiento (p. ej., de al menos 12 nt) de una secuencia en la hebra sentido o en la hebra antisentido.

Así pues:

5 Se describe un agente de RNAi que comprende: una hebra antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra antisentido, y/o una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la hebra sentido, de cualquiera del grupo de: AD-20807 y AD-20832 (o cualquier otro grupo presentado en la tabla 2).

10 Se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la primera hebra, y/o la segunda hebra comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nt de la segunda hebra, de cualquiera del grupo de: AD-20807 y AD-20832 (o cualquier otro grupo presentado en la tabla 2).

15 Se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras, en donde la primera hebra comprende o consiste de la secuencia de una primera hebra, y/o la segunda hebra comprende o consiste en la secuencia de la segunda hebra, de cualquiera del grupo de: AD-20807 y AD-20832 (o cualquier otro grupo presentado en la tabla 2).

20 Se describe un agente de RNAi que comprende una primera y una segunda hebras (en donde la primera y la segunda hebras pueden estar facultativamente unidas de forma covalente, unidas a través de un bucle o de un conector, o contiguas) y en donde la primera y/o la segunda hebra comprenden, consisten esencialmente o consisten en secuencias con 0, 1, 2 o 3 nt o pares de bases discordantes de cualquiera del grupo de: AD-20807 y AD-20832 (o cualquier otro grupo presentado en la tabla 2), que comprende además de forma optativa 0-10 nt o pb.

Se describen grupos de agentes de RNAi solapantes que se presentan en la tabla 2.

Definiciones adicionales

25 Los artículos «un» y «una», tal y como se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones, se refieren a uno o varios de uno (al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

La terminología «agente de RNAi», «agentes de RNAi», «agente o agentes de RNAi» y similares se refieren, sin limitación, a uno o varios agentes de RNAi de la presente descripción.

30 Las designaciones de las dobles hebras de ejemplo concretas de los agentes de RNAi del β -ENaC descritos en la presente memoria a veces tienen el sufijo «b» seguido de un número. Esto indica un número de lote. Así pues, el sufijo «b1» indica «lote 1». Así pues, una doble hebra de RNAi denominada, por ejemplo, «AD-20807-b1» es específicamente del lote 1 y tiene la misma secuencia que cualquier agente de RNAi denominado «AD-20807».

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que conoce habitualmente un especialista familiarizado con el campo al cual pertenece la presente descripción.

35 A menos que se indique de otra manera, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida de por sí, como le quedará claro al experto en la técnica. Por ejemplo, se hace referencia de nuevo a los manuales de texto estándares y a la técnica de los antecedentes generales mencionados en la presente memoria.

40 Los expertos en la técnica pueden inventar diferentes formulaciones adicionales y variantes obvias de los agentes de RNAi del β -ENaC que se han descrito. Los agentes de RNAi del β -ENaC de los ejemplos no limitantes se describen en los ejemplos que vienen a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Bioinformática y secuencias del agente de RNAi (siRNA) del β -ENaC

45 El diseño de los oligonucleótidos del β -ENaC se realiza para identificar los siRNA que actúan selectivamente sobre los ARNm que codifican el gen de β -ENaC [«canal ionótrofo de sodio, independiente del voltaje, 1» de las secuencias humana (SCNN1B, símbolo para humano del NCBI) y las ortólogas del macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) y la rata (*Rattus norvegicus*)]. El procedimiento del diseño utiliza los transcritos del SCNNB1 NM_000336.2 de humano (Geneld del NCBI 6338), NM_012648.1 de rata (Geneld del NCBI 24767) y una secuencia de macaco cangrejero de longitud completa (descrita en la presente memoria).

50

Todos los siRNA bicatenarios se diseñan para que tengan una identidad del 100% con los tres transcritos de

SCNNB1. Todas las secuencias son del transcrito NM_000336.

Las secuencias sin modificar y modificadas se recogen en la tabla 1. Las secuencias sin modificar incluyen las secuencias sentido y antisentido que se recogen como SEQ ID n.º 111 a 220. Se dan a conocer las posiciones relativas del primer resto en comparación con el transcrito del β-ENaC humano en la SEQ ID n.º 222.

- 5 Tal y como se describe a continuación, la tabla 1 también da a conocer variantes modificadas de ejemplo de estas secuencias (SEQ ID n.º 1 a 110). Para las columnas de la tabla 1, «S» representa la hebra sentido, «AS» representa la hebra antisentido y «Pos'n» representa la posición del primer nucleótido. Los nucleótidos modificados, que se indican mediante las minúsculas (p. ej., «c» y «u») son como se describe en la tabla 1A que viene a continuación.
- 10 En las secuencias de la tabla 1, las secuencias modificadas y sin modificar pueden comprender de forma optativa la secuencia «dTsdT» en el extremo 3'. Así pues, por ejemplo, AD-20805 puede tener facultativamente la secuencia cAGuGAcuAcAAcAcGAccdTsdT (SEQ ID n.º 429) en la hebra sentido y GGUCGUGUUGuAGUcACUGdTsdT (SEQ ID n.º 430) en la hebra antisentido. Tal y como se señala en la tabla 1A, a continuación, dT es 2'-desoxitimidina-5'-fosfato y sdT es 2'-desoxitimidina-5'-fosforotioato.
- 15 Tabla 1. Secuencias del β-ENaC

ID de la doble hebra		SEQ ID	Secuencia modificada	SEQ ID	Secuencia sin modificar	Pos'n
AD-20805	S	1	cAGuGAcuAcAAcAcGAcc	111	CAGUGACUACAACACGACC	1298
	AS	2	GGUCGUGUUGuAGUcACUG	112	GGUCGUGUUGUAGUCACUG	1298
AD-20806	S	3	AuGAcAGAGAAGGcAcuuc	113	AUGACAGAGAAGGCACUUC	1011
	AS	4	GAAGUGCCUUCUCUGUcAU	114	GAAGUGCCUUCUCUGUCAU	1011
AD-20807	S	5	GuGAAGAAGuAccuGcuGA	115	GUGAAGAAGUACCUGCUGA	183
	AS	6	UcAGcAGGuACUUCUUCAC	116	UCAGCAGGUACUUCUUCAC	183
AD-20808	S	7	GuGAcuAcAAcAcGAccuA	117	GUGACUACAACACGACCUA	1300
	AS	8	uAGGUCGUGUUGuAGUcAC	118	UAGGUCGUGUUGUAGUCAC	1300
AD-20809	S	9	GGuGGAGGcccAcAccAAc	119	GGUGGAGGCCACACCAAC	1919
	AS	10	GUUGGUGUGGGCCUCcACC	120	GUUGGUGUGGGCCUCCACC	1919
AD-20810	S	11	uGGuGGAGGcccAcAccAA	121	UGGUGGAGGCCACACCAA	1918
	AS	12	UUGGUGUGGGCCUCcAcCA	122	UUGGUGUGGGCCUCCACCA	1918
AD-20811	S	13	uuccAAGAccAcAuGAucc	123	UCCAAGACCACAUGAUCC	1347
	AS	14	GGAUcAUGUGGUCUUGGAA	124	GGAUCAUGUGGUCUUGGAA	1347
AD-20812	S	15	AGcuGGGAGGucAGcGucu	125	AGCUGGGAGGUCAGCGUCU	402
	AS	16	AGACGCUGACCUCCcAGCU	126	AGACGCUGACCUCCAGCU	402
AD-20813	S	17	GGGAGAAuAcuGcAAcAA	127	GGGAGAAUACUGCAACAA	1408
	AS	18	UUGUUGcAGuAUUUCUCCC	128	UUGUUGCAGUAUUUCUCCC	1408
AD-20814	S	19	ccAGuuuGGcuucuGGAuG	129	CCAGUUUGGCUUCUGGAUG	1748
	AS	20	cAUCcAGAAGCcAAACUGG	130	CAUCCAGAAGCCAACUGG	1748

ES 2 574 204 T3

AD-20815	S	21	AGuGAcuAcAAcAcGAccu	131	AGUGACUACAACACGACCU	1299
	AS	22	AGGUCGUGUUGuAGUcACU	132	AGGUCGUGUUGUAGUCACU	1299
AD-20816	S	23	AAuAucAcccuGAGcAGGA	133	AAUAUCACCCUGAGCAGGA	1626
	AS	24	UCCUGCUcAGGGUGAuAUU	134	UCCUGCUCAGGGUGAUUU	1626
AD-20817	S	25	ccuGcAGGccAccAAcAuc	135	CCUGCAGGCCACCAACAUC	836
	AS	26	GAUGUUGGUGGCCUGcAGG	136	GAUGUUGGUGGCCUGCAGG	836
AD-20818	S	27	AucAcccuGAGcAGGAAGG	137	AUCACCCUGAGCAGGAAGG	1629
	AS	28	CCUCCUGCUcAGGGUGAU	138	CCUCCUGCUCAGGGUGAU	1629
AD-20819	S	29	GcuGGGAGGucAGcGucuc	139	GCUGGGAGGUCAGCGUCUC	403
	AS	30	GAGACGCUGACCUCcAGC	140	GAGACGCUGACCUCcCAGC	403
AD-20820	S	31	GAGcuGGGAGGucAGcGuc	141	GAGCUGGGAGGUCAGCGUC	401
	AS	32	GACGCUGACCUCcAGCUC	142	GACGCUGACCUCcCAGCUC	401
AD-20821	S	33	GuGGcAGuuuGGcuucuG	143	GUGGCCAGUUUGGCUUCUG	1744
	AS	34	cAGAAGCcAAACUGGCcAC	144	CAGAAGCCAACUGGCCAC	1744
AD-20822	S	35	cAGuuuGGcuucuGGAuGG	145	CAGUUUGGCUUCUGGAUGG	1749
	AS	36	CcAUCcAGAAGCcAAACUG	146	CCAUCCAGAAGCCAACUG	1749
AD-20823	S	37	GGccAGuuuGGcuucuGGA	147	GGCCAGUUUGGCUUCUGGA	1746
	AS	38	UCcAGAAGCcAAACUGGCC	148	UCCAGAAGCCAACUGGCC	1746
AD-20824	S	39	cuGGGuGGccAGuuuGGcu	149	CUGGGUGGCCAGUUUGGCU	1740
	AS	40	AGCcAAACUGGCcACCcAG	150	AGCCAACUGGCCACCCAG	1740
AD-20825	S	41	ucuAcAGuGAcuAcAAcAc	151	UCUACAGUGACUACAACAC	1294
	AS	42	GUGUUGuAGUcACUGuAGA	152	GUGUUGUAGUCACUGUAGA	1294
AD-20826	S	43	GcAuGAcAGAGAAGGcAcu	153	GCAUGACAGAGAAGGCACU	1009
	AS	44	AGUGCCUUCUCUGUcAUGC	154	AGUGCCUUCUCUGUCAUGC	1009
AD-20827	S	45	AuAucAcccuGAGcAGGAA	155	AUAUCACCCUGAGCAGGAA	1627
	AS	46	UUCCUGCUcAGGGUGAuAU	156	UUCCUGCUCAGGGUGAUUU	1627
AD-20828	S	47	cuAcAGuGAcuAcAAcAcG	157	CUACAGUGACUACAACACG	1295
	AS	48	CGUGUUGuAGUcACUGuAG	158	CGUGUUGUAGUCACUGUAG	1295
AD-20829	S	49	uAucAcccuGAGcAGGAAG	159	UAUCACCCUGAGCAGGAAG	1628
	AS	50	CUUCCUGCUcAGGGUGAuA	160	CUUCCUGCUCAGGGUGAUUU	1628
AD-20830	S	51	uGcAGGccAccAAcAucuu	161	UGCAGGCCACCAACAUCUU	838
	AS	52	AAGAUGUUGGUGGCCUGcA	162	AAGAUGUUGGUGGCCUGCA	838
AD-20831	S	53	cAuGAcAGAGAAGGcAcuu	163	CAUGACAGAGAAGGCACUU	1010

ES 2 574 204 T3

	AS	54	AAGUGCCUUCUCUGUcAUG	164	AAGUGCCUUCUCUGUCAUG	1010
AD-20832	S	55	uGAAGAAGuAccuGcuGAA	165	UGAAGAAGUACCUGCUGAA	184
	AS	56	UUCAGcAGGuACUUCUUA	166	UUCAGCAGGUACUUCUUA	184
AD-20833	S	57	GcuGGuGGAGGcccAcAcc	167	GCUGGUGGAGGCCACACC	1916
	AS	58	GGUGUGGGCCUCcACcAGC	168	GGUGUGGGCCUCCACCAGC	1916
AD-20834	S	59	uAcAGuGAcuAcAAcAcGA	169	UACAGUGACUACAACACGA	1296
	AS	60	UCGUGUUGuAGUcACUGuA	170	UCGUGUUGUAGUCACUGUA	1296
AD-20835	S	61	AcAGAGAAGGcAcuuccuu	171	ACAGAGAAGGCACUCCUU	1014
	AS	62	AAGGAAGUGCCUUCUCUGU	172	AAGGAAGUGCCUUCUCUGU	1014
AD-20836	S	63	AcAGuGAcuAcAAcAcGAc	173	ACAGUGACUACAACACGAC	1297
	AS	64	GUCGUGUUGuAGUcACUGU	174	GUCGUGUUGUAGUCACUGU	1297
AD-20837	S	65	uGAGcuGGGAGGucAGcGu	175	UGAGCUGGGAGGUCAGCGU	400
	AS	66	ACGCUGACCUCcAGCUcA	176	ACGCUGACCUCcCAGCUcA	400
AD-20838	S	67	uGGccAGuuuGGcuucuGG	177	UGGCCAGUUUGGCUUCUGG	1745
	AS	68	CcAGAAGCcAAACUGGCcA	178	CCAGAAGCCAAACUGGCCA	1745
AD-20839	S	69	uGucucAGGAGcGGGAccA	179	UGUCUCAGGAGCGGGACCA	1600
	AS	70	UGGUCCCGCUCCUGAGAcA	180	UGGUCCCGCUCCUGAGACA	1600
AD-20840	S	71	GuGGAGGcccAcAccAAcu	181	GUGGAGGCCACACCAACU	1920
	AS	72	AGUUGGUGUGGGCCUCcAC	182	AGUUGGUGUGGGCCUCCAC	1920
AD-20841	S	73	GGGuGGccAGuuuGGcuuc	183	GGGUGGCCAGUUUGGCUUC	1742
	AS	74	GAAGCcAAACUGGCcACCC	184	GAAGCCAAACUGGCCACCC	1742
AD-20842	S	75	GGuGGccAGuuuGGcuucu	185	GGUGGCCAGUUUGGCUUCU	1743
	AS	76	AGAAGCcAAACUGGCcACC	186	AGAAGCCAAACUGGCCACC	1743
AD-20843	S	77	ucAcccuGAGcAGGAAGGG	187	UCACCCUGAGCAGGAAGGG	1630
	AS	78	CCCUUCCUGCUcAGGGUGA	188	CCCUUCCUGCUCAGGGUGA	1630
AD-20844	S	79	GccAGuuuGGcuucuGGAu	189	GCCAGUUUGGCUUCUGGAU	1747
	AS	80	AUCcAGAAGCcAAACUGGC	190	AUCCAGAAGCCAAACUGGC	1747
AD-20845	S	81	AGcuGGuGGAGGcccAcAc	191	AGCUGGUGGAGGCCACAC	1915
	AS	82	GUGUGGGCCUCcACcAGCU	192	GUGUGGGCCUCCACCAGCU	1915
AD-20846	S	83	AucuccAuGGcuGAcuGGc	193	AUCUCCAUGGCUGACUGGC	1545
	AS	84	GCCAGUcAGCcAUGGAGAU	194	GCCAGUCAGCCAUGGAGAU	1545
AD-20847	S	85	GGcAuGAcAGAGAAGGcAc	195	GGCAUGACAGAGAAGGCAC	1008
	AS	86	GUGCCUUCUCUGUcAUGCC	196	GUGCCUUCUCUGUCAUGCC	1008

ES 2 574 204 T3

AD-20848	S	87	GGAGAAAUAcuGcAAcAAc	197	GGAGAAAUACUGCAACAAC	1409
	AS	88	GUUGUUGcAGuAUUUCUCC	198	GUUGUUGCAGUAUUUCUCC	1409
AD-20849	S	89	uGGGuGGccAGuuuGGcuu	199	UGGGUGGCCAGUUUGGCUU	1741
	AS	90	AAGCcAAACUGGCcACCcA	200	AAGCCAAACUGGCCACCCA	1741
AD-20850	S	91	GAGcuGGuGGAGGcccAcA	201	GAGCUGGUGGAGGCCcACA	1914
	AS	92	UGUGGGCCUCcACcAGCUC	202	UGUGGGCCUCCACCAGCUC	1914
AD-20851	S	93	GAcAGAGAAGGcAcuuccu	203	GACAGAGAAGGCACUCCU	1013
	AS	94	AGGAAGUGCCUUCUCUGUC	204	AGGAAGUGCCUUCUCUGUC	1013
AD-20852	S	95	AGuuuGGcuucuGGAuGGG	205	AGUUUGGCUUCUGGAUGGG	1750
	AS	96	CCcAUCcAGAAGCcAAACU	206	CCCAUCCAGAAGCCAAACU	1750
AD-20861	S	97	uGAcAGAGAAGGcAcuucc	207	UGACAGAGAAGGCACUCC	1012
	AS	98	GGAAGUGCCUUCUCUGUCa	208	GGAAGUGCCUUCUCUGUCA	1012
AD-20862	S	99	GAAGAAGuAccuGcuGAAG	209	GAAGAAGUACCUGCUGAAG	185
	AS	100	CUUCAGcAGGuACUUCUUC	210	CUUCAGCAGGUACUUCUUC	185
AD-20863	S	101	ucuccAuGGcuGAcuGGcc	211	UCUCCAUGGCUGACUGGCC	1546
	AS	102	GGCcAGUcAGCcAUGGAGA	212	GGCCAGUCAGCCAUGGAGA	1546
AD-20864	S	103	cuGGuGGAGGcccAcAccA	213	CUGGUGGAGGCCcACACCA	1917
	AS	104	UGGUGUGGGCCUCcACcAG	214	UGGUGUGGGCCUCCACCAG	1917
AD-20865	S	105	cAGAGAAGGcAcuuccuuc	215	CAGAGAAGGCACUCCUUC	1015
	AS	106	GAAGGAAGUGCCUUCUCUG	216	GAAGGAAGUGCCUUCUCUG	1015
AD-20866	S	107	cuGcAGGccAccAAcAucu	217	CUGCAGGCCACCAACAUCU	837
	AS	108	AGAUGUUGGUGGCCUGcAG	218	AGAUGUUGGUGGCCUGCAG	837
AD-20867	S	109	GGGcAuGAcAGAGAAGGcA	219	GGGCAUGACAGAGAAGGCA	1007
	AS	110	UGCCUUCUCUGUCaUGCCC	220	UGCCUUCUCUGUCAUGCCC	1007

Las modificaciones de las secuencias de los agentes de RNAi de las SEQ ID n.^{os} 111 a 220 las concibe con facilidad el experto en la técnica. Los ejemplos y modificaciones no limitantes de estas secuencias se conciben y también se recogen en la tabla 1, p. ej., las secuencias sentido y antisentido (AS) en las SEQ ID n.^{os} 1 a 110.

5 Algunas modificaciones se colocan en los sitios que se predice que son sensibles a las endonucleasas. Algunas modificaciones se diseñan para eliminar una respuesta inmunitaria contra el siRNA a la vez que se conserva la actividad. En general, la hebra sentido está muy modificada y la hebra antisentido ligeramente modificada. Algunas modificaciones sirven para más de un propósito.

Las secuencias de la tabla 1 y las otras tablas se representan con estas abreviaturas:

TABLA 1A. ABREVIATURAS

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	Adenosina-5'-fosfato
C	Citidina-5'-fosfato
G	Guanosina-5'-fosfato
dT	2'-Deesoxitimidina-5'-fosfato
U	Uridina-5'-fosfato
c	2'-O-Metilcitidina-5'-fosfato
u	2'-O-Metiluridina-5'-fosfato
sdT	2'-Desoxitimidina-5'-fosforotioato

Selección de secuencias de siRNA

- Un total de 55 oligonucleótidos sentido de siRNA procedentes del SCNNB1 de humano y 55 oligonucleótidos antisentido de siRNA procedentes de SCNNB1 de humano (agentes de RNAi del β -ENaC) se sintetizan como se describe en el ejemplo 2. Los oligonucleótidos sentido y sus respectivos oligonucleótidos antisentido se hibridan en dobles hebras.

Ejemplo 1A

Conjuntos solapantes de los agentes de RNAi del β -ENaC

- 10 Se describen grupos de agentes de RNAi del β -ENaC con secuencias solapantes. Así pues, la presente descripción comprende grupos de agentes de RNAi en los que cada agente de RNAi del grupo se solapa con otro agente de RNAi del mismo grupo en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más nucleótidos. En concreto, se describe que el solapamiento es de al menos 12 nt.

- 15 Algunos de los agentes de RNAi recogidos en la presente memoria se solapan unos con otros en la secuencia. La tabla 2 presenta una compilación de algunos de estos grupos de agentes de RNAi solapantes, en donde cada miembro de un grupo se solapa con otro miembro del mismo grupo por al menos 12 nt. Se presenta una porción de 12 nt del solapamiento de la hebra sentido y antisentido.

- Así pues, por ejemplo, tal y como se muestra en la tabla 2, se solapan las secuencias de los agentes de RNAi AD-20807 y AD-20832, en donde el solapamiento en la hebra sentido comprende la secuencia UGAAGAAGUACC (SEQ ID n.º 223); estos agentes de RNAi también se solapan en la secuencia de la hebra antisentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia GGUACUUCUUCA (SEQ ID n.º 224). Los agentes de RNAi AD-20807, AD-20862 y AD-20832 se solapan en la hebra sentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia GAAGAAGUACCU (SEQ ID n.º 225); estos agentes de RNAi se solapan en la hebra antisentido, en donde el solapamiento comprende la secuencia AGGUACUUCUUC (SEQ ID n.º 226). Así pues, estos y otros conjuntos diferentes de agentes de RNAi solapantes presentados en la tabla 2 comparten peculiaridades técnicas comunes, por ejemplo, el solapamiento en la hebra sentido y en la hebra antisentido.

A continuación, en la tabla 2, se dan a conocer conjuntos concretos de agentes de RNAi solapantes del β -ENaC.

- Así pues, se describe cualquier grupo o subgrupo de agentes de RNAi que comprenden una peculiaridad técnica común, en donde la peculiaridad técnica común es un solapamiento (p. ej., de al menos 12 nt) de una secuencia en la hebra sentido o en la hebra antisentido.

ES 2 574 204 T3

Tabla 2

Pos	Solapamiento en sentido	SEQ ID	Solapamiento en antisentido	SEQ ID	Agentes de solapantes del β -ENaC RNAi
183	UGAAGAAGUACC	223	GGUACUUCUUCA	224	AD-20807, AD-20832
184	GAAGAAGUACCU	225	AGGUACUUCUUC	226	AD-20807, AD-20862, AD-20832
185	AAGAAGUACCUG	227	CAGGUACUUCUU	228	AD-20807, AD-20862, AD-20832
186	AGAAGUACCUGC	229	GCAGGUACUUCU	230	AD-20807, AD-20862, AD-20832
187	GAAGUACCUGCU	231	AGCAGGUACUUC	232	AD-20807, AD-20862, AD-20832
188	AAGUACCUGCUG	233	CAGCAGGUACUU	234	AD-20807, AD-20862, AD-20832
189	AGUACCUGCUGA	235	UCAGCAGGUACU	236	AD-20807, AD-20862, AD-20832
190	GUACCUGCUGAA	237	UUCAGCAGGUAC	238	AD-20862, AD-20832
400	GAGCUGGGAGGU	239	ACCUCCCAGCUC	240	AD-20820, AD-20837
401	AGCUGGGAGGUC	241	GACCUCCCAGCU	242	AD-20820, AD-20812, AD-20837
402	GCUGGGAGGUCA	243	UGACCUCCCAGC	244	AD-20820, AD-20819, AD-20812, AD-20837
403	CUGGGAGGUCAG	245	CUGACCUCCCAG	246	AD-20819, AD-20812, AD-20837
404	UGGGAGGUCAGC	247	GCUGACCUCCCA	248	AD-20820, AD-20819, AD-20837
405	GGGAGGUCAGCG	249	CGCUGACCUCCC	250	AD-20820, AD-20819, AD-20812, AD-20837
406	GGAGGUCAGCGU	251	ACGCUGACCUCC	252	AD-20819, AD-20837
407	GAGGUCAGCGUC	253	GACGCUGACCUC	254	AD-20820, AD-20819, AD-20812
408	AGGUCAGCGUCU	255	AGACGCUGACCU	256	AD-20819, AD-20812
836	CUGCAGGCCACC	257	GGUGGCCUGCAG	258	AD-20866, AD-20817
837	UGCAGGCCACCA	259	UGGUGGCCUGCA	260	AD-20866, AD-20830, AD-20817
838	GCAGGCCACCAA	261	UUGGUGGCCUGC	262	AD-20866, AD-20830, AD-20817
839	CAGGCCACCAAC	263	GUUGGUGGCCUG	264	AD-20866, AD-20830, AD-20817
840	AGGCCACCAACA	265	UGUUGGUGGCCU	266	AD-20866, AD-20830, AD-

ES 2 574 204 T3

					20817
841	GGCCACCAACAU	267	AUGUUGGUGGCC	268	AD-20866, AD-20830, AD-20817
842	GCCACCAACAUC	269	GAUGUUGGUGGC	270	AD-20866, AD-20830, AD-20817
843	CCACCAACAUCU	271	AGAUGUUGGUGG	272	AD-20866, AD-20830
1007	GGCAUGACAGAG	273	CUCUGUCAUGCC	274	AD-20847, AD-20867
1008	GCAUGACAGAGA	275	UCUCUGUCAUGC	276	AD-20826, AD-20867
1009	CAUGACAGAGAA	277	UUCUCUGUCAUG	278	AD-20826, AD-20831, AD-20867
1010	AUGACAGAGAAG	279	CUUCUCUGUCAU	280	AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806
1011	UGACAGAGAAGG	281	CCUUCUCUGUCA	282	AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1012	GACAGAGAAGGC	283	GCCUUCUCUGUC	284	AD-20851, AD-20847, AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1013	ACAGAGAAGGCA	285	UGCCUUCUCUGU	286	AD-20851, AD-20835, AD-20847, AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1014	CAGAGAAGGCAC	287	GUGCCUUCUCUG	288	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20826, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1015	AGAGAAGGCACU	289	AGUGCCUUCUCU	290	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20826, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1016	GAGAAGGCACUU	291	AAGUGCCUUCUC	292	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1017	AGAAGGCACUUC	293	GAAGUGCCUUCU	294	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20806, AD-20861
1018	GAAGGCACUUC	295	GGAAGUGCCUUC	296	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20861
1019	AAGGCACUUCU	297	AGGAAGUGCCUU	298	AD-20851, AD-20835, AD-20865
1020	AGGCACUUCU	299	AAGGAAGUGCCU	300	AD-20835, AD-20865
1294	CUACAGUGACUA	301	UAGUCACUGUAG	302	AD-20828, AD-20825
1295	UACAGUGACUAC	303	GUAGUCACUGUA	304	AD-20834, AD-20825
1296	ACAGUGACUACA	305	UGUAGUCACUGU	306	AD-20828, AD-20834, AD-20825, AD-20836
1297	CAGUGACUACAA	307	UUGUAGUCACUG	308	AD-20834, AD-20805, AD-20825
1298	AGUGACUACAAC	309	GUUGUAGUCACU	310	AD-20828, AD-20834, AD-20805, AD-20825, AD-20836
1299	GUGACUACAACA	311	UGUUGUAGUCAC	312	AD-20834, AD-20805, AD-20808, AD-20825
1300	UGACUACAACAC	313	GUGUUGUAGUCA	314	AD-20828, AD-20834, AD-

ES 2 574 204 T3

					20805, AD-20808, AD-20825, AD-20815, AD-20836
1301	GACUACAACACG	315	CGUGUUGUAGUC	316	AD-20828, AD-20834, AD-20805, AD-20808, AD-20836
1302	ACUACAACACGA	317	UCGUGUUGUAGU	318	AD-20834, AD-20805, AD-20808
1303	CUACAACACGAC	319	GUCGUGUUGUAG	320	AD-20805, AD-20808, AD-20815, AD-20836
1304	UACAACACGACC	321	GGUCGUGUUGUA	322	AD-20805, AD-20808
1305	ACAACACGACCU	323	AGGUCGUGUUGU	324	AD-20808, AD-20815
1408	GGAGAAAUACUG	325	CAGUAUUUCUCC	326	AD-20813, AD-20848
1409	GAGAAAUACUGC	327	GCAGUAUUUCUC	328	AD-20813, AD-20848
1410	AGAAAUACUGCA	329	UGCAGUAUUUCU	330	AD-20813, AD-20848
1411	GAAAUACUGCAA	331	UUGCAGUAUUUC	332	AD-20813, AD-20848
1412	AAAUACUGCAAC	333	GUUGCAGUAUUU	334	AD-20813, AD-20848
1413	AAUACUGCAACA	335	UGUUGCAGUAUU	336	AD-20813, AD-20848
1414	AUACUGCAACAA	337	UUGUUGCAGUAU	338	AD-20813, AD-20848
1545	UCUCCAUGGCUG	339	CAGCCAUGGAGA	340	AD-20846, AD-20863
1546	CUCCAUGGCUGA	341	UCAGCCAUGGAG	342	AD-20846, AD-20863
1547	UCCAUGGCUGAC	343	GUCAGCCAUGGA	344	AD-20846, AD-20863
1548	CCAUGGCUGACU	345	AGUCAGCCAUGG	346	AD-20846, AD-20863
1549	CAUGGCUGACUG	347	CAGUCAGCCAUG	348	AD-20846, AD-20863
1550	AUGGCUGACUGG	349	CCAGUCAGCCAU	350	AD-20846, AD-20863
1551	UGGCUGACUGGC	351	GCCAGUCAGCCA	352	AD-20846, AD-20863
1626	AUAUCACCCUGA	353	UCAGGGUGAUAU	354	AD-20816, AD-20827
1627	UAUCACCCUGAG	355	CUCAGGGUGAUA	356	AD-20816, AD-20827, AD-20829
1628	AUCACCCUGAGC	357	GCUCAGGGUGAU	358	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20818
1629	UCACCCUGAGCA	359	UGCUCAGGGUGA	360	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1630	CACCCUGAGCAG	361	CUGCUCAGGGUG	362	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1631	ACCCUGAGCAGG	363	CCUGCUCAGGGU	364	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1632	CCCUGAGCAGGA	365	UCCUGCUCAGGG	366	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1633	CCUGAGCAGGAA	367	UCCUGCUCAGG	368	AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1634	CUGAGCAGGAAG	369	CUUCCUGCUCAG	370	AD-20829, AD-20843, AD-20818
1635	UGAGCAGGAAGG	371	CCUCCUGCUCUA	372	AD-20843, AD-20818
1740	UGGGUGGCCAGU	373	ACUGGCCACCCA	374	AD-20824, AD-20849
1741	GGGUGGCCAGUU	375	AACUGGCCACCC	376	AD-20824, AD-20841, AD-20849
1742	GGUGGCCAGUUU	377	AAACUGGCCACC	378	AD-20824, AD-20842, AD-20841, AD-20849

ES 2 574 204 T3

1743	GUGGCCAGUUUG	379	CAAACUGGCCAC	380	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20841, AD-20849
1744	UGGCCAGUUUGG	381	CCAAACUGGCCA	382	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20849
1745	GGCCAGUUUGGC	383	GCCAAACUGGCC	384	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1746	GCCAGUUUGGCU	385	AGCCAAACUGGC	386	AD-20844, AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1747	CCAGUUUGGCUU	387	AAGCCAAACUGG	388	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1748	CAGUUUGGCUUC	389	GAAGCCAAACUG	390	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20822, AD-20823
1749	AGUUUGGCUUCU	391	AGAAGCCAAACU	392	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1750	GUUUGGCUUCUG	393	CAGAAGCCAAAC	394	AD-20814, AD-20844, AD-20821, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1751	UUUGGCUUCUGG	395	CCAGAAGCCAAA	396	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1752	UUGGCUUCUGGA	397	UCCAGAAGCCAA	398	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20822, AD-20823
1753	UGGCUUCUGGAU	399	AUCCAGAAGCCA	400	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20822
1754	GGCUUCUGGAUG	401	CAUCCAGAAGCC	402	AD-20814, AD-20852, AD-20822
1755	GCUUCUGGAUGG	403	CCAUCCAGAAGC	404	AD-20852, AD-20822
1914	AGCUGGUGGAGG	405	CCUCCACCAGCU	406	AD-20850, AD-20845
1915	GCUGGUGGAGGC	407	GCCUCCACCAGC	408	AD-20850, AD-20845, AD-20833
1916	CUGGUGGAGGCC	409	GGCCUCCACCAG	410	AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1917	UGGUGGAGGCCC	411	GGGCCUCCACCA	412	AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1918	GGUGGAGGCCCA	413	UGGGCCUCCACC	414	AD-20809, AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1919	GUGGAGGCCAC	415	GUGGGCCUCCAC	416	AD-20809, AD-20810, AD-

					20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1920	UGGAGGCCACACA	417	UGUGGGCCUCCA	418	AD-20809, AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1921	GGAGGCCACACAC	419	GUGUGGGCCUCC	420	AD-20809, AD-20810, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1922	GAGGCCACACACC	421	GGUGUGGGCCUC	422	AD-20809, AD-20810, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1923	AGGCCACACCA	423	UGGUGUGGGCCU	424	AD-20809, AD-20810, AD-20864, AD-20840
1924	GGCCACACCAA	425	UUGGUGUGGGCC	426	AD-20809, AD-20810, AD-20840
1925	GCCACACCAAC	427	GUUGGUGUGGGC	428	AD-20809, AD-20840

Se indica la posición («Pos») en NM_000336.2. Se presentan 12 nt de ejemplo del solapamiento en la hebra sentido y en la hebra antisentido; en muchos casos, el solapamiento es realmente más largo.

Ejemplo 2

Síntesis de las secuencias de los agentes de RNAi del β -ENaC

- 5 Las secuencias de agentes de RNAi del β -ENaC recogidas como SEQ ID n.^{os} 1 a 110 en la tabla 1 se sintetizan en un sintetizador MerMade 192 a una escala de 1 μ mol.

Para todas las secuencias de la lista, se aplica la química 'endolight' tal y como se detalla a continuación.

Todas las pirimidinas (citosina y uridina) de la misma hebra contienen bases 2'-O-metiladas (2'-O-metil-C y 2'-O-metil-U).

- 10 En la hebra antisentido, las pirimidinas adyacentes (a saber, hacia la posición en 5') al ribonucleósido A están reemplazadas por sus correspondientes nucleósidos 2-O-metilados.

Se introduce una extensión dTsdT de dos bases en el extremo 3' de ambas secuencias sentido y antisentido.

El archivo de secuencias se convierte en un archivo de texto para hacerlo compatible para la carga en el programa informático de síntesis de MerMade 192.

- 15 Síntesis, escisión y desprotección:

La síntesis de las secuencias del β -ENaC utiliza la síntesis de oligonucleótidos en soporte sólido mediante la química de fosoramiditas.

La síntesis de las secuencias anteriores se realiza a una escala de 1 μ m en placas de 96 pocillos. Las soluciones de amiditas se preparan a una concentración de 0,1 M y se utiliza etiltiotetrazol (0,6 M en acetonitrilo) como activador.

- 20 Las secuencias sintetizadas se escinden y desprotegen en placas de 96 pocillos, mediante el uso de metilamina en la primera etapa y del reactivo fluorado en la segunda etapa. Las secuencias brutas se precipitan con una mezcla de acetona:etanol (80:20) y los sedimentos se resuspenden en tampón de acetato de sodio a 0,2 M. Las muestras de cada secuencia se analizan mediante LC-MS para confirmar la identidad, mediante UV para la cuantificación, y un conjunto seleccionado de muestras mediante cromatografía de intercambio iónico para determinar la pureza.

- 25 Purificación y desalado:

Las secuencias del β -ENaC se purifican en un sistema de purificación explorador AKTA con la columna Source 15Q. Se mantiene una temperatura de columna de 65 °C durante la purificación. La inyección y la recogida de las muestras se realiza en placas de 96 pocillos (1,8 ml, pocillos profundos). En el eluyente se recoge un pico único que corresponde a la secuencia de longitud completa. Las secuencias purificadas se desalan en una columna de Sephadex G25 utilizando el purificador AKTA. A las secuencias del β -ENaC desaladas se les analiza la concentración (mediante la medición con UV a A260) y la pureza (mediante HPLC de intercambio de iones).

- 30

Las hebras monocatenarias se someten a continuación a hibridación.

En la tabla 1, más arriba, se muestra una lista detallada de las hebras monocatenarias y bicatenarias del β -ENaC. Las dobles hebras se utilizan en un cribado *in vitro* para analizar su capacidad para atenuar el nivel del gen del β -ENaC.

Ejemplo 3

5 Cribado *in vitro* de los agentes de RNAi del β -ENaC

Los agentes de RNAi del β -ENaC se criban *in vitro* por la determinación de su capacidad para atenuar el nivel del gen del β -ENaC.

Cultivo de células y transfecciones:

Las células H441 (ATCC, Manassas, VA) se hacen crecer hasta casi la confluencia a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% en RPMI 1640 (ATCC) complementado con SBF al 10%, estreptomina y glutamina (ATCC) antes de liberarse de la placa para el tratamiento con tripsina. La transfección inversa se realiza por la adición de 5 μ l de Opti-MEM a 5 μ l de siRNA bicatenario por pocillo en una placa de 96 pocillos junto con 10 μ l de Opti-MEM más 0,2 μ l de lipofectamina RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. Cat. n.º 13778-150) y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se le añaden 80 μ l del medio de crecimiento completo sin antibiótico que contiene 2,0 $\times 10^4$ células H441. Las células se incuban durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Los experimentos se realizan a una concentración final de la doble hebra de 0,1 o 10 nM para cribados de dosis única con cada una de las 55 dobles hebras del β -ENaC. Cada siRNA se transfecta 3 veces a cada una de las dosis analizadas. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Un subconjunto de dobles hebras que muestra el silenciamiento robusto en los cribados a 10 nM y 0,1 nM se ensaya sobre un margen de concentraciones de 10 nM a 10 fM mediante diluciones en serie para determinar su CI₅₀. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Aislamiento del ARN total:

Las células se recogen y se lisan en 140 μ l de la solución de lisis/fijación y a continuación se mezclan durante 1 minuto a 850 rpm con un termomezclador Eppendorf (la velocidad de la mezcla fue la misma durante todo el proceso).

Para aislar el ARN total se utiliza un kit de aislamiento del ARN total MagMAX-96 (Applied Biosystem, Foster City CA, parte n.º: AM1830). Se le añaden 20 μ l de perlas magnéticas y la mezcla del potenciador de lisis/fijación en el lisado celular y se mezclan durante 5 minutos. Las perlas magnéticas se capturan con un soporte magnético y el sobrenadante se retira sin alterar las perlas. Después de retirar el sobrenadante, las perlas magnéticas se lavan con la solución 1 de lavado (se añade isopropanol) y se mezcla durante 1 minuto. Las perlas se capturan de nuevo y el sobrenadante se retira. A continuación se lavan las perlas con 150 μ l de la solución 2 de lavado (se añade etanol), se capturan y se retira el sobrenadante. A continuación se añaden 50 μ l de la mezcla de ADNasa (tampón de ADNasa turbo MagMax y ADNasa Turbo) a las perlas y se mezclan durante 10 a 15 minutos. Después de la mezcla, se le añaden 100 μ l de la solución de refijación de ARN y se mezcla durante 3 minutos. El sobrenadante se retira y las perlas magnéticas se lavan de nuevo con 150 μ l de la solución 2 de lavado y se mezcla durante 1 minuto y el sobrenadante se retira completamente. Las perlas magnéticas se mezclan durante 2 minutos para secar antes de que el ARN se eluya con 50 μ l de agua.

Síntesis del ADNc:

Para la síntesis del ADNc se utiliza el kit de retrotranscripción de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat n.º 4368813). Una mezcla madre de 2 μ l de tampón a 10X, 0,8 μ l de dNTP a 25X, 2 μ l de cebadores al azar, 1 μ l de transcriptasa inversa, 1 μ l de inhibidor de ARNasas y 3,2 μ l de H₂O por reacción se añade a 10 μ l de ARN total. El ADNc se genera con un termociclador de Bio-Rad (Hercules, CA) C-1000 o S-1000 a través de las etapas siguientes: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C, 5 s a 85 °C, mantener a 4 °C.

PCR en tiempo real:

Se añaden 2 μ l del ADNc a una mezcla madre que contiene 0,5 μ l de la sonda TaqMan de la GAPDH (Applied Biosystems. Cat. n.º 4326317E), 0,5 μ l de la sonda TaqMan del β -ENaC (Applied Biosystems. Cat. n.º Hs00165722_m1) y 5 μ l de la mezcla madre de sondas de Roche (Roche cat. n.º 04887301001) en un total de 10 μ l por pocillo en una placa de 384 pocillos del LightCycler 480 (Roche cat. n.º 0472974001). Se realiza la PCR en tiempo real en una máquina de PCR en tiempo real LightCycler 480 (Roche). Cada doble hebra se analiza en dos transfecciones independientes y cada transfección se ensaya por duplicado.

Los datos en tiempo real se analizan con el método $\Delta\Delta$ Ct. Cada muestra se normaliza por la expresión de la GAPDH y se evalúa la atenuación con respecto a las células transfectadas con la doble hebra AD-1955 que carece de acción selectiva. Los CI₅₀ se definen con un modelo de ajuste de 4 parámetros en XLfit.

Los resultados se muestran a continuación. La tabla 3 muestra los resultados de los experimentos realizados a

concentraciones finales de doble hebra de 0,1 nM o 10 nM para cribados a cada dosis con cada una de las 55 dobles hebras del β -ENaC. La «fracción restante de mensajero» indica el nivel residual del gen, a 10 nM o 0,1 nM. Así pues, «0,17» en la segunda columna para AD-20832-b1 indica que, a una concentración de 10 nM, había un nivel residual del gen del 17%, o una atenuación de la expresión del 83%. Obsérvese también que el sufijo «b1» indica «lote 1». Así pues, por ejemplo, un agente de RNAi con la denominación «AD-20832-b1» tiene la misma secuencia que un agente de RNAi denominado «AD-20832».

Tabla 3. Atenuación del β -ENaC a 10 nM y a 0,1 nM

	Fracción restante de mensajero a 10 nM	Fracción restante de mensajero a 0,1 nM	Desviación estándar a 10 nM	Desviación estándar a 0,1 nM
AD-20832-b1	0,17	0,33	0,04	0,03
AD-20848-b1	0,17	0,49	0,01	0,04
AD-20807-b1	0,18	0,26	0,02	0,05
AD-20826-b1	0,19	0,49	0,02	0,22
AD-20837-b1	0,19	0,51	0,04	0,04
AD-20861-b1	0,19	0,71	0,02	0,29
AD-20834-b1	0,20	0,34	0,06	0,05
AD-20806-b1	0,22	0,60	0,02	0,15
AD-20851-b1	0,23	0,55	0,04	0,07
AD-20865-b1	0,24	0,64	0,02	0,05
AD-20811-b1	0,25	0,52	0,17	0,23
AD-20819-b1	0,27	0,60	0,01	0,07
AD-20839-b1	0,27	0,55	0,06	0,05
AD-20835-b1	0,28	0,63	0,07	0,21
AD-20825-b1	0,30	0,72	0,11	0,15
AD-20867-b1	0,30	0,68	0,00	0,20
AD-20813-b1	0,34	0,56	0,17	0,36
AD-20823-b1	0,34	0,75	0,05	0,05
AD-20805-b1	0,36	0,86	0,02	0,09
AD-20831-b1	0,36	0,60	0,01	0,21
AD-20862-b1	0,38	0,93	0,02	0,29
AD-20808-b1	0,40	0,81	0,13	0,16
AD-20827-b1	0,40	2,55	0,07	1,44
AD-20828-b1	0,42	0,89	0,11	0,25
AD-20812-b1	0,47	0,74	0,32	0,36
AD-20836-b1	0,48	1,07	0,11	0,27
AD-20822-b1	0,49	0,94	0,11	0,09
AD-20810-b1	0,53	0,87	0,25	0,20
AD-20824-b1	0,54	1,12	0,08	0,33
AD-20844-b1	0,55	0,98	0,07	0,28
AD-20814-b1	0,60	1,30	0,09	0,12
AD-20838-b1	0,65	1,18	0,07	0,18
AD-20816-b1	0,66	1,38	0,05	0,17
AD-20845-b1	0,72	1,18	0,01	0,27
AD-20820-b1	0,75	0,89	0,06	0,14

ES 2 574 204 T3

AD-20830-b1	0,75	0,94	0,04	0,24
AD-20866-b1	0,77	1,24	0,03	0,57
AD-20809-b1	0,78	1,05	0,05	0,03
AD-20833-b1	0,79	0,99	0,01	0,35
AD-20821-b1	0,80	0,99	0,07	0,14
AD-20846-b1	0,83	1,13	0,10	0,15
AD-20818-b1	0,88	1,36	0,04	0,62
AD-20817-b1	0,89	1,11	0,11	0,19
AD-20843-b1	0,92	1,64	0,11	0,16
AD-20840-b1	0,93	1,13	0,15	0,30
AD-20847-b1	0,94	0,99	0,64	0,12
AD-20815-b1	0,96	2,06	0,23	0,99
AD-20842-b1	0,96	1,37	0,16	0,28
AD-20852-b1	0,96	1,30	0,17	0,17
AD-20863-b1	0,99	0,84	0,24	0,11
AD-20864-b1	0,99	1,36	0,05	0,74
AD-20850-b1	1,00	1,22	0,14	0,14
AD-20829-b1	1,08	1,39	0,26	0,70
AD-20849-b1	1,11	1,31	0,27	0,17
AD-20841-b1	1,12	1,37	0,10	0,48

Todos los agentes de RNAi del β -ENaC utilizados en estos experimentos eran las secuencias modificadas (SEQ ID n.^{os} 1 a 110) recogidas en la tabla 1.

- 5 La tabla 4 muestra los resultados de los experimentos, en donde un subconjunto de dobles hebras que muestran un silenciamiento robusto de los cribados a 10 nM y 0,1 nM se ensaya a lo largo de un margen de concentraciones de 10 nM a 10 fM mediante diluciones en serie para determinar su CI_{50} .

Tabla 4. Escrutinio de respuesta del β -ENaC a la dosis

ID de la doble hebra	H441 nueva (media de 4 replicas)		H441 vieja (media de 8 replicas)	
	CI_{50} nM	CI_{50} Desviación estándar	CI_{50} nM	CI_{50} Desviación estándar
AD-20807	0,05	0,03	0,04	0,06
AD-20826	0,14	0,05	0,05	0,07
AD-20832	0,05	0,02	0,04	0,05
AD-20834	0,06	0,03	0,03	0,06
AD-20848	0,25	0,14	0,13	0,17
AD-20861	0,13	0,08	0,09	0,06

Ejemplo 4

- 10 Análisis *in vivo* de los agentes de RNAi del β -ENaC AD-20807 y AD-20832

En experimentos *in vivo*, dos agentes de RNAi del β -ENaC, AD-20807 y AD-20832, se les analiza su capacidad para atenuar el nivel del gen del β -ENaC en pulmones enteros de ratas. El propósito es determinar la respuesta en función de la dosis. También se mide la inmunoestimulación.

- 15 La cepa de rata utilizada es Sprague-Dawley; los individuos tienen una masa aproximada de 280-300 g. Las ratas se dosifican una vez al día durante dos días. A continuación se sacrifican aproximadamente 24 h después de la

segunda dosis. El pulmón izquierdo se toma y se muele para determinar por qPCR el nivel del β -ENaC; el pulmón derecho se congela y se conserva.

Tabla 5

Grupo	Números de las ratas	Formulación	Concentración	Ratas por grupo
1	1-5	D5W	NA	5
2	6-10	AD1955	10 mg/kg	5
3	11-15	AD20191	10 mg/kg	5
4	16-20	AD20807	10 mg/kg	5
5	21-25	AD20807	3 mg/kg	5
6	26-30	AD20807	1 mg/kg	5
7	31-35	AD20832	10 mg/kg	4*
8	36-40	AD20832	3 mg/kg	5
9	41-45	AD20832	1 mg/kg	5

*En el grupo de 4, inicialmente se dosifican 5 ratas, pero 1 de cada grupo no sobrevive al experimento y no se incluye en los datos finales.

Ambos agentes de RNAi del β -ENaC, AD20807 y AD20832, muestran reducciones del nivel del β -ENaC de una manera dependiente de la dosis. Para AD20807, el nivel del β -ENaC se reduce aproximadamente el 30%, 40% y 50% a las dosis de 1, 3 y 10 mg/kg, respectivamente.

10 En cambio, los agentes de RNAi del β -ENaC (β -ENaC) no disminuyen el nivel del α -ENaC (α -ENaC). No obstante, hay un incremento del α -ENaC con la administración de AD20832.

Los controles negativos incluyen:

15 D5W: una solución de dextrosa al 5% en agua; es el vehículo utilizado para diluir el siRNA cuando se dosifica; AD1955: un siRNA que no actúa selectivamente de manera específica sobre el α -ENaC ni sobre el β -ENaC, sino que actúa selectivamente sobre la luciferasa; y AD20191: un siRNA que no se fija al β -ENaC, sino que actúa selectivamente sobre el α -ENaC de rata; y AD-9201, que actúa selectivamente sobre el α -ENaC (no se usa en este ejemplo concreto).

Así pues, la atenuación específica del β -ENaC se observa con los agentes de RNAi AD20807 y AD20832 en este experimento.

20 Ejemplo 5

Análisis *in vivo* del AD-20834 del β -ENaC

En los experimentos *in vivo*, al agente de RNAi del β -ENaC AD20834 se le analiza su capacidad para atenuar el nivel del gen del β -ENaC en los pulmones enteros de ratas. El propósito es determinar las respuestas a las dosis. También se mide la inmunoestimulación.

25 La cepa de rata es Sprague-Dawley; los individuos tienen una masa aproximada de 280-300 g. Las ratas se dosifican una vez al día durante dos días. A continuación, se sacrifican aproximadamente 24 horas después de la segunda dosis. El pulmón izquierdo se toma y se muele para determinar por qPCR el nivel del β -ENaC; el pulmón derecho se congela y se conserva.

Tabla 6

Grupo	Rata n. ^{os}	Formulación	Concentración	Ratas por grupo
1	1-5	D5W	NA	5
2	6-10	AD1955	10 mg/kg	4*
3	11-15	AD20191	10 mg/kg	5
4	16-20	AD20834	10 mg/kg	5
5	21-25	AD20834	3 mg/kg	5
6	26-30	AD20834	1 mg/kg	4*

*En los grupos de 4, inicialmente se dosificaron 5 ratas, pero 1 de cada grupo no sobrevive al experimento y no se incluye en los datos finales.

5 Suponiendo un peso de 300 g (0,3 kg), se realizan las siguientes diluciones:

10 mg/kg = 3 mg de siRNA en un volumen de 200 μ l = 15 mg/ml

3 mg/kg = 1 mg de siRNA en un volumen de 200 μ l = 5 mg/ml

1 mg/kg = 0,3 mg de siRNA en un volumen de 200 μ l = 1,5 mg/ml

Los datos se normalizan por la PPIB [peptidil-prolil cis-trans isomerasa B, utilizada como gen de mantenimiento (normalización)].

Los experimentos muestran que el agente de RNAi del β -ENaC AD20834 muestra una reducción de aproximadamente el 40% del nivel del β -ENaC en las ratas Sprague-Dawley. Este efecto es específico del β -ENaC.

Los controles son los siguientes: D5W (dextrosa al 5% en agua) es un control negativo, que no muestra ningún efecto sobre el nivel del α -ENaC ni del β -ENaC. AD1955, un siRNA de control que no se fija ni al α -ENaC ni al β -ENaC, y que también muestra poco efecto sobre el nivel de α -ENaC o β -ENaC. AD20191 es el siRNA de control positivo, que actúa selectivamente sobre el α -ENaC, pero no sobre el β -ENaC, muestra una reducción de aproximadamente el 50% del nivel del α -ENaC, pero no del β -ENaC.

Así pues, una dosis de 10 mg/kg del agente de RNAi del β -ENaC AD20834 muestra al menos una inhibición de aproximadamente el 40% de la expresión del gen del β -ENaC en las ratas Sprague-Dawley.

20 Ejemplo 6

Análisis de los agentes de RNAi del β -ENaC

Se realiza un experimento adicional con los agentes de RNAi del β -ENaC AD20807, AD20832, AD20834, AD20848 y AD20861 *in vivo* en las ratas Sprague-Dawley. A las ratas se les dosifican 10 mg/kg en D5W el día 1 y el día 2, se sacrifican el día 3 y se recogen los pulmones.

25 Los resultados se muestran en la figura 1. Los resultados muestran los datos de qPCR del pulmón izquierdo, normalizado por el gen de control de la PPIB.

Los controles de la figura 1 son los siguientes: D5W (dextrosa al 5% en agua) es un control negativo que no muestra ningún efecto sobre el nivel del α -ENaC ni del β -ENaC. El control positivo es AD-9201, que actúa selectivamente sobre el α -ENaC (aENaC).

30 Los resultados, mostrados en la figura 1, muestran una atenuación estadísticamente significativa y específica del β -ENaC por la acción de AD20807, AD20832, AD20834, AD20848 y AD20861. La expresión del gen del β -ENaC se inhibe al menos aproximadamente el 40% a una concentración de 10 mg/kg de estos agentes de RNAi en las ratas Sprague-Dawley.

Ejemplo 7

35 Efecto *in vitro* del agente de RNAi del β -ENaC AD20832 sobre la actividad funcional del canal ENaC en las células epiteliales bronquiales de humano

Las células epiteliales bronquiales de humano (CEBH) se transfectan con el siRNA indicado, que incluye el agente de RNAi del β -ENaC AD20832. Las células transfectadas se inoculan en insertos de Snapwell y se cultivan durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo apical se retira de cada inserto y las células se cultivan en una interfaz

aire-líquido (ALI). A las células se les ensaya la actividad del ENaC y del CFTR el día 8 después del ALI, tal y como está descrito. Para controlar la viabilidad celular, la función del ENaC se normaliza por la actividad del CFTR y los datos se presentan como un porcentaje con respecto al control sin transfectar (figura 2A). Como control adicional de la viabilidad, también se mide la resistencia transmembranaria (figura 2B). Los análisis de expresión del ARNm de las subunidades α y β del ENaC se realizan para cada inserto y se normalizan por la expresión de la GAPDH (figura 2C). Los datos muestran que una inhibición del 70% de la expresión del ARNm es suficiente para generar una inhibición funcional del 50% del canal ENaC. Esto es cierto para la atenuación de las subunidades α o β , donde cada una se compara con los controles de siRNA sin transfectar (neg) e inespecíficos (ns). Los datos también muestran que el siRNA del β -ENaC no inhibe la expresión del ARNm del α -ENaC y viceversa.

10 Métodos: actividad funcional del ENaC en las células epiteliales bronquiales de humano

Las células epiteliales bronquiales de humano (CEBH) se compran a Lonza y se pasan una vez antes de congelarlas en el medio de crecimiento (BEGM más *singlequots*; Lonza). Posteriormente, las células se descongelan, se expanden hasta la confluencia y se dividen 1:10 para la transfección. Una vez que están a una confluencia del 80%, cada matraz de células se transfecta con el siRNA indicado a 30 nM, con Lipofectamina 2000 a 2 μ l/ml en un volumen total de 30 ml de medio de transfección (mezcla 1:1 de BEGM (Lonza) y DMEM con glucosa alta (Gibco) sin aditivos). A cabo de 24 horas de la transfección, las células se inoculan en insertos Snapwell de 6 pocillos (Costar) a $2,5 \times 10^5$ células/inserto en medio de diferenciación (mezcla 50:50 de BEBM y DMEM/glucosa alta con *singlequots* (menos los complementos de triyodotreonina y ácido retinoico, en donde el ácido todo-*trans*-retinoico se añade por separado a 50 nM). Las células se complementan apicalmente con 0,5 ml de medio de diferenciación y, basolateralmente, con 2,5 ml de medio de diferenciación. Después de otras 24 horas de cultivo sobre los insertos, se reemplaza el medio basolateral y se retira el medio apical, tomando así las células para el cultivo en interfaz aire-líquido (ALI). A las células se les analiza la actividad del ENaC y del CFTR el día 8 (D8) tras la ALI.

Para valorar el fenotipo del transporte de iones de las células transfectadas, los insertos Snapwell se montan en cámaras de difusión verticales (Costar) y se bañan continuamente con la solución de Ringer gasificada (CO₂ al 5% en O₂; pH 7,4) mantenida a 37 °C que contiene (en mM): 120 de NaCl, 25 de NaHCO₂, 3,3 de KH₂PO₄, 0,8 de K₂HPO₄, 1,2 de CaCl₂, 1,2 de MgCl₂ y 10 de glucosa (la osmolaridad se mantuvo entre 280 y 300 mosmol/l). Las células se sometieron a un voltaje zonal de 0 mV (modelo EVC4000, WPI). Se mide la resistencia transmembranaria (resTM) con la aplicación de un pulso de 2 mV a intervalos de 30 s y se calcula la resTM mediante la ley de Ohm. Los datos de la corriente del cortocircuito se registran con una estación PowerLab (ADI Instruments). La actividad del canal ENaC de cada grupo se valora por el cambio de la corriente de cortocircuito tras la adición apical de amilorida a 10 μ M, el bloqueante del ENaC (corriente sensible a la amilorida). La secreción del cloruro a través de CFTR se valora por el cambio de la corriente de cortocircuito después de la adición apical y basolateral de forskolina a 0,6 μ M, que se sabe que activa el CFTR (respuesta de forskolina). Para cada inserto, la corriente sensible a la amilorida se normaliza por la respuesta a la forskolina, y los datos se presentan como un porcentaje con respecto al control sin transfectar. Al final del estudio, cada inserto se lisa para analizar el ARN (300 μ l de tampón RLT; Qiagen) y las muestras se conservan para el análisis posterior de la atenuación del ARNm por RT-PCR tal y como está descrito.

Abreviaturas:

ALI	Interfaz aire-líquido
40 BEGM	Medio de crecimiento epitelial bronquial
D6, D8	Día 6, día 8
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
CEBH	Células epiteliales bronquiales de humano
ResTM	Resistencia transmembranaria

45

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente de RNAi que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la hebra antisentido de un agente de RNAi específico del β -ENaC de acuerdo con la secuencia de SEQ ID n.º 170.
- 5 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un segundo agente de RNAi del β -ENaC dado a conocer en la tabla 1.
3. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el agente de RNAi comprende al menos un esqueleto modificado y/o al menos un nucleótido con modificación en 2'.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente de RNAi está
10 ligado a uno o varios agentes seleccionados de: compuesto de diagnóstico, grupo indicador, agente de entrecruzamiento, resto que confiere resistencia a las nucleasas, nucleobase natural o inusual, molécula lipófila, colesterol, lípido, lectina, esteroide, uvaol, hecigenina, diosgenina, terpeno, triterpeno, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol, vitamina, glúcido, dextrano, pululano, quitina, quitosano, glúcido sintético, oligolactato de 15 restos, polímero natural, polímero de masa molecular baja o media, inulina, ciclodextrina, ácido
15 hialurónico, proteína, agente de fijación a proteínas, molécula que actúa selectivamente sobre la integrina, policatiónico, péptido, poliamina, imitador peptídico y/o transferrina.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde todas las pirimidinas son nucleótidos con modificación por 2'-O-metilación.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la longitud de la hebra
20 sentido y de la antisentido son cada una de al menos 19 nucleótidos y no más de 30 nucleótidos; y en donde la hebra sentido y/o antisentido está modificada o sin modificar.
7. Utilización de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el β -ENaC en un individuo.
8. La utilización de la reivindicación 7, en donde la enfermedad relacionada con el β -ENaC es fibrosis quística,
25 pseudohipoaldosteronismo de tipo 1 (PHA1), síndrome de Liddle, hipertensión, alcalosis, hipopotasiemia y/o hipertensión asociada a la obesidad.
9. La utilización de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la composición comprende además un antagonista adicional del ENaC.
10. Una composición farmacéutica, que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las
30 reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

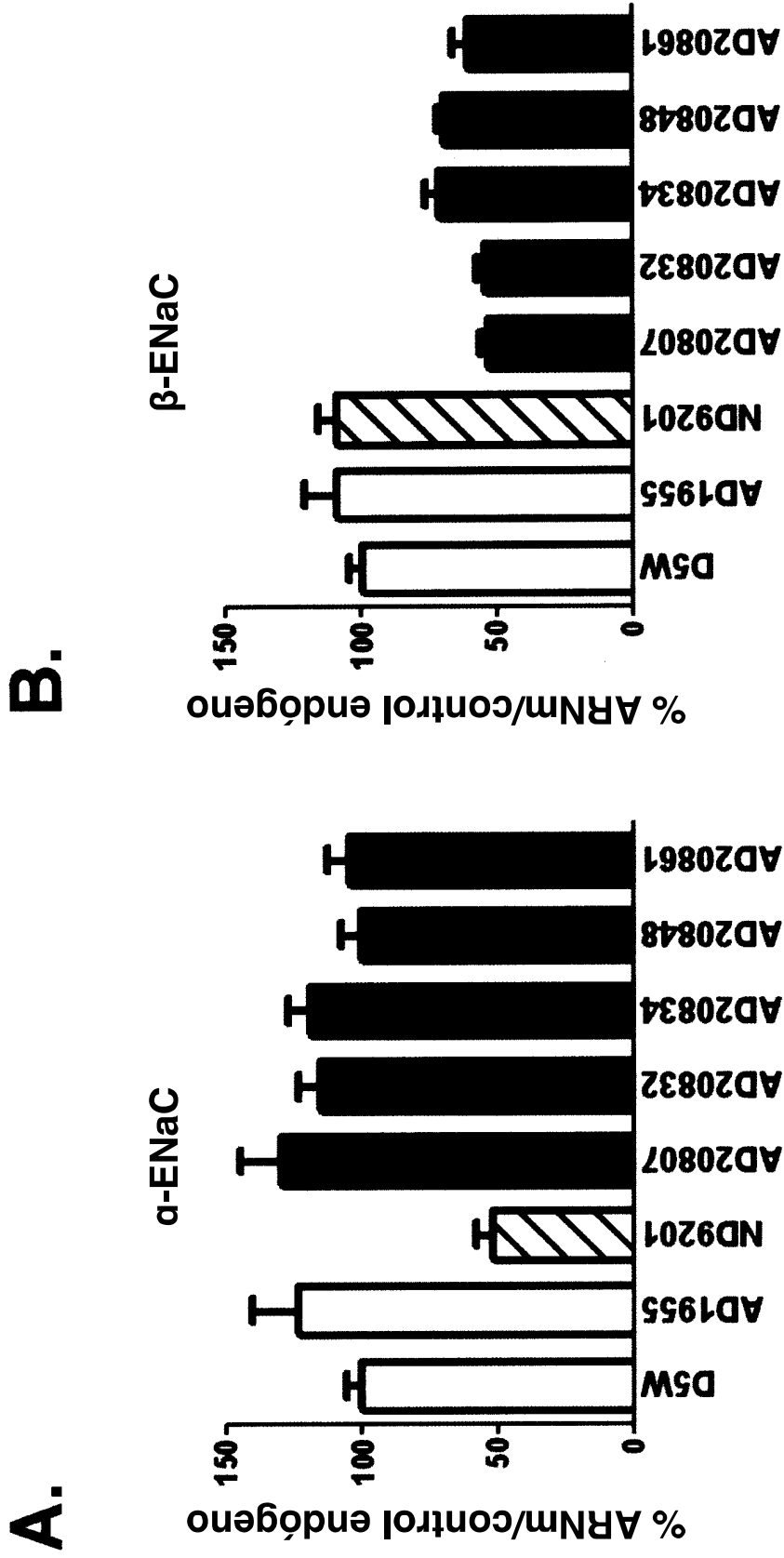


FIG. 1

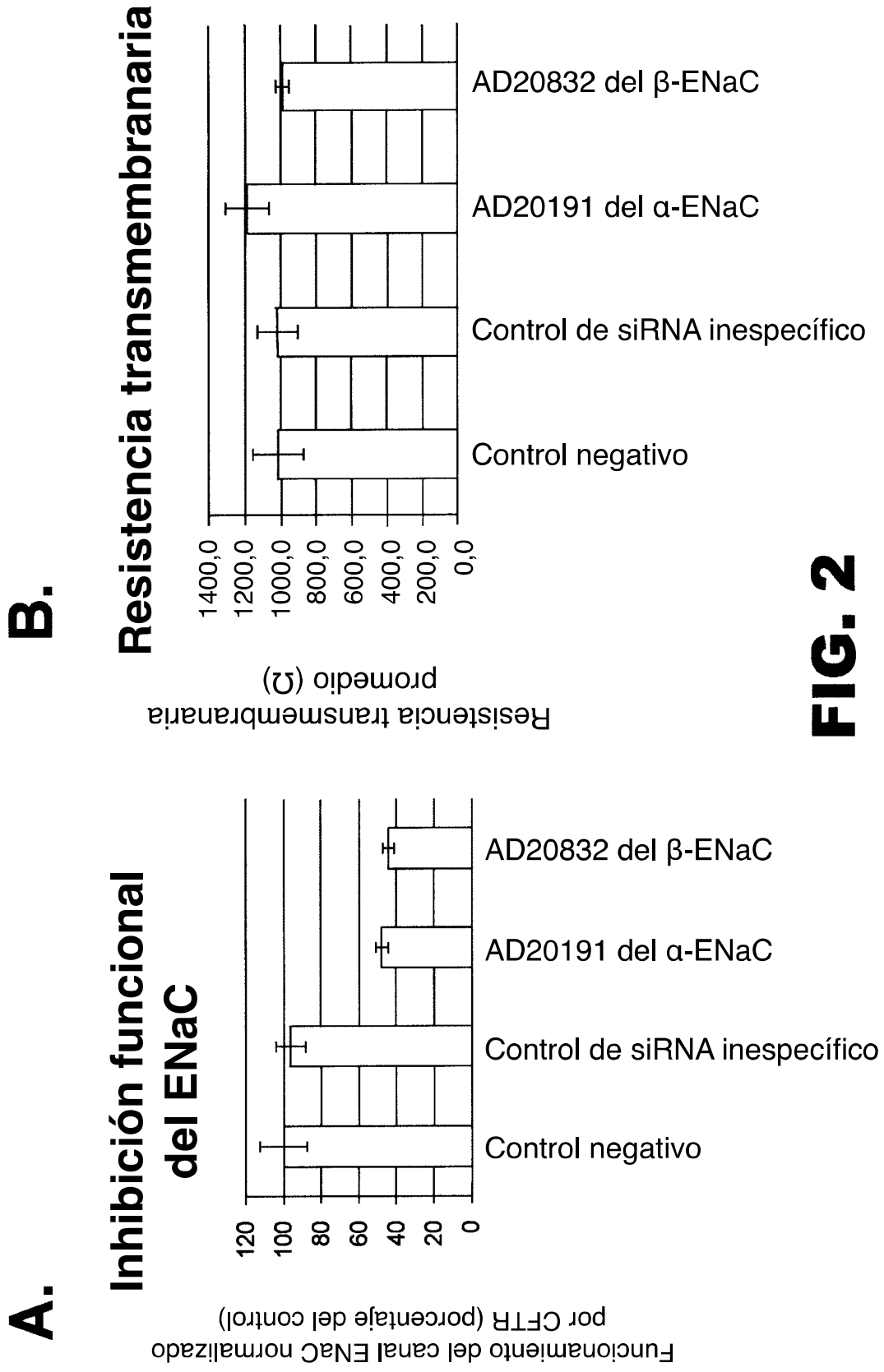


FIG. 2

C.

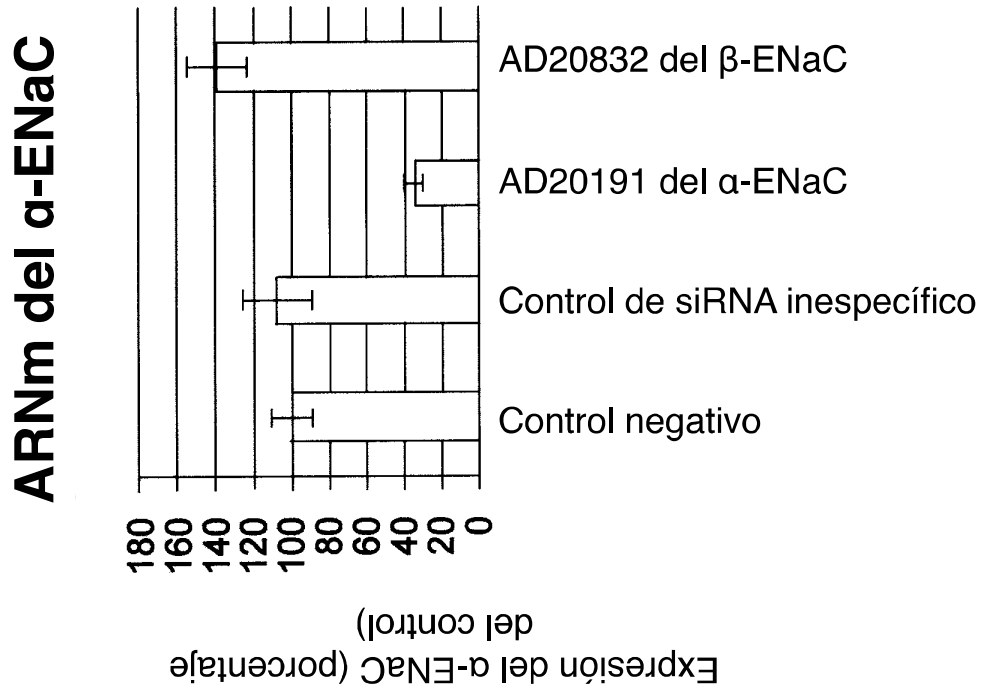
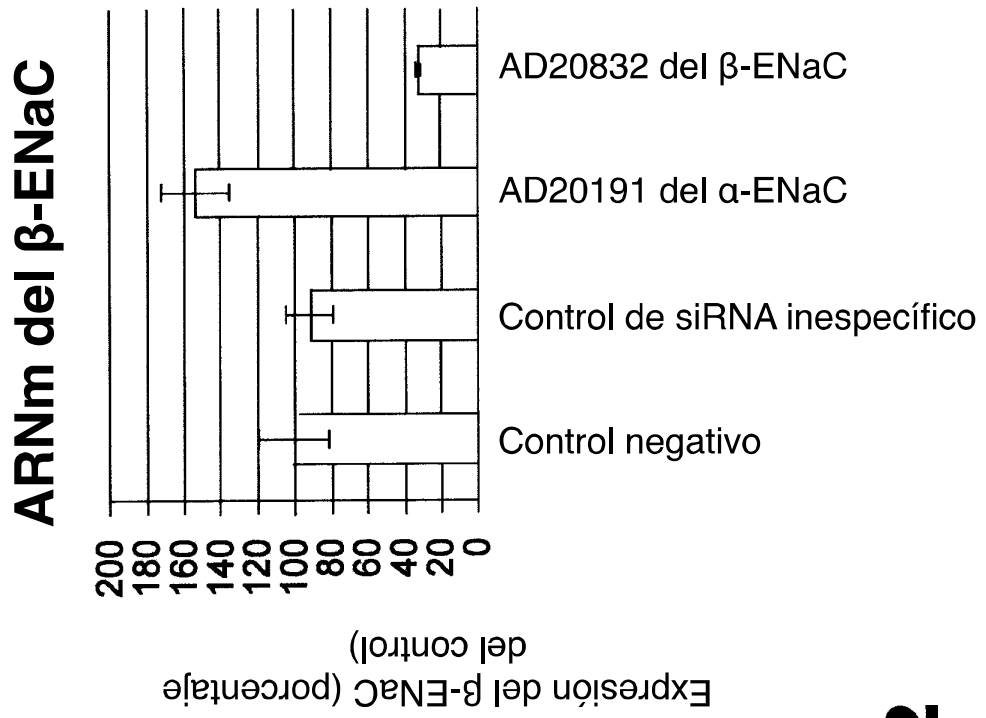


FIG. 2