(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 941 477**

(51) Int. CI.:

A61P 35/04 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/136 (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2013 E 19189895 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023 EP 3626309**

(54) Título: **Agonista de LXRbeta para el tratamiento de cáncer**

(30) Prioridad:

13.08.2012 US 201261682339 P
14.03.2013 US 201361784057 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2023

(73) Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 York Avenue
New York, NY 10065, US

(72) Inventor/es:

TAVAZOIE, SOHAIL y
PENCHEVA, NORA, G.

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Agonista de LXRbeta para el tratamiento de cáncer

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/682,339 presentada el 13 de agosto de 2012 y la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/784,057 presentada el 14 de marzo de 2013.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de cánceres migratorios y melanoma. Cualquier referencia a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Antecedentes de la invención

El melanoma, un tumor maligno, se desarrolla a partir de melanocitos anormales en la epidermis inferior y puede metastatizar en sitios distantes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático. Aunque representa menos del 5 % de los casos de cáncer de piel, el melanoma es mucho más peligroso y es responsable de una gran mayoría de las muertes asociadas con el cáncer de piel. En todo el mundo, la incidencia del melanoma se ha incrementado a una velocidad alarmante, con un riesgo vital de desarrollar melanoma tan alto como 1/58 para los hombres en los EE.UU. (Jemal *et al.*, 2008, CA: Cancer J. Clin. 58:71-96). La tasa de mortalidad del melanoma maligno también continúa creciendo dramáticamente a lo largo del mundo. Según un informe de la OMS de 2006, se producen aproximadamente 48.000 muertes relacionadas con melanoma en todo el mundo por año (Lucas *et al.* (2006) Environmental Burden of Disease Series. 13. World Health Organization. ISBN 92-4-159440-3). En los Estados Unidos, se estimó que casi 70.000 personas fueron diagnosticadas con melanoma durante 2010 y se espera que aproximadamente 9.000 personas mueran como consecuencia de la enfermedad (American Cancer Society; www.cancer.org).

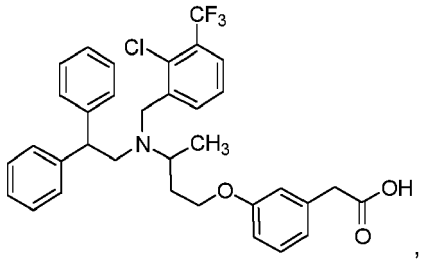
Chuu *et al.* (2007) J Biomed Sci, 14: 543-553, describe la modulación de la señalización del receptor X hepático como una nueva terapia para el cáncer de próstata.

El documento WO 2008/011071 da a conocer un agonista de inhibición de *Hedgehog* de receptor X hepático.

Aunque algunas terapias de cáncer convencionales se han usado para tratar melanoma metastásico, estas no son efectivas. El melanoma metastásico permanece, por lo tanto, como uno de los cánceres más difíciles de tratar y uno de los neoplasmas más temidos. De acuerdo con esto, existe una necesidad de nuevos agentes y métodos para el diagnóstico y tratamiento del melanoma.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención presenta un agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita mediante ralentización de la diseminación de metástasis del cáncer y mediante el incremento del nivel de expresión o el nivel de actividad de ApoE, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer colorrectal, linfoma, carcinoma hepatocelular, y cáncer de próstata, y en donde el agonista de LXRβ es:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones adicionales, el cáncer es resistente a vemurafenib, dacarbazina, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD1, o un inhibidor de PDL1.

El agonista LXRβ puede ser para administración con un antiproliferativo, en donde dicho agonista de LXR y dicho antiproliferativo se administran en una cantidad que, conjuntamente, es suficiente como para ralentizar la progresión del cáncer migratorio. Por ejemplo, el antiproliferativo y el agonista de LXR pueden administrarse en 28 días de separación (p. ej., en 21, 14, 10, 7, 5, 4, 3, 2, o 1 días) o en 24 horas (p. ej., 12, 6, 3, 2, o 1 horas; o concomitantemente) de separación en cantidades que, conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto.

El agonista LXRβ puede ser para administración con un compuesto antiproliferativo seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, agentes de platino, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa, antibióticos antitumorales, agentes antimitóticos, inhibidores de aromatasa, inhibidores de la timidilato sintasa, antagonistas de ADN, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de bombas, inhibidores de histona acetiltransferasa, inhibidores de metaloproteinasa, inhibidores de ribonucleósido reductasa, agonistas/antagonistas de TNF alfa, antagonista del receptor de endotelina A, agonistas del receptor del ácido retinoico, inmunomoduladores, agentes hormonales y antihormonales, agentes fotodinámicos, inhibidores de tirosina quinasa, compuestos antisentido, corticosteroides, inhibidores de HSP90, inhibidores de proteosoma (por ejemplo, NPI-0052), inhibidores de CD40, anticuerpos anti-CSI, inhibidores de FGFR3, inhibidores de VEGF, inhibidores de MEK, inhibidores de ciclina D1, inhibidores de NF-kB, antraciclinas, histona desacetilasas, inhibidores de quinesina, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de COX2, inhibidores de mTOR, antagonistas de calcineurina, IMiD, u otros agentes usados para tratar enfermedades proliferativas. Los ejemplos de dichos compuestos se proporcionan en las Tablas 1.

Tal y como se usa en la presente memoria, “cáncer migratorio” se refiere a un cáncer en el que las células cancerosas que forman el tumor migran y posteriormente crecen como implantes malignos en un sitio distinto al sitio del tumor original. Las células cancerosas migran a través de la siembra de la superficie de los espacios peritoneal, pleural, pericárdico, o subaracnoideo para diseminarse en las cavidades corporales; mediante la invasión del sistema linfático a través de la invasión de células linfáticas y transporte a nódulos linfáticos regionales y distantes y después a otras partes del cuerpo; mediante la diseminación hematógena a través de la invasión de células sanguíneas; o a través de la invasión del tejido circundante. Los cánceres migratorios incluyen tumores metastásicos y cánceres con migración celular, tales como cáncer de ovario, mesotelioma, y cáncer de pulmón primario, cada uno de los cuales se caracteriza por la migración celular.

Tal y como se usa en la presente memoria, “ralentización de la diseminación de cáncer migratorio” se refiere a reducir o parar la formación de nuevos loci; o reducir, parar, o revertir la carga tumoral.

Tal y como se usa en la presente memoria, “tumor metastásico” se refiere a un tumor o cáncer en el que las células cancerosas que forman el tumor tienen un alto potencial para o han empezado a, metastatizar, o diseminarse desde una localización a otra localización o localizaciones en un sujeto, a través del sistema linfático o a través de una diseminación hematógena, por ejemplo, creando tumores secundarios en el sujeto. Dicho comportamiento metastásico puede ser indicativo de tumores malignos. En algunos casos, el comportamiento metastásico puede estar asociado con un incremento en la migración celular y/o comportamiento invasivo de las células tumorales.

Tal y como se usa en la presente memoria, “ralentización de la diseminación de metástasis” se refiere a reducir o parar la formación de nuevos loci; o reducir, parar, revertir la carga tumoral.

El término “cáncer” se refiere a cualquier cáncer causado por la proliferación de células neoplásicas malignas, tales como tumores, neoplasmas, carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas, y semejantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, “cáncer resistente a fármacos” se refiere a cualquier cáncer que es resistente a un antiproliferativo de la Tabla 2.

Los ejemplos de cánceres que pueden definirse como metastásicos incluyen, pero no están limitados a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro incluyendo glioblastomas y meduloblastomas, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, neoplasmas hematológicos, mieloma múltiple, leucemia, neoplasmas intraepiteliales, cáncer de hígado, linfomas, neuroblastomas, cáncer oral, cáncer pancreático, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel incluyendo melanoma, cáncer basocelular, cáncer de células escamosas, cáncer testicular, tumores estromales, tumores de células germinales, cáncer de tiroides, y cáncer renal.

“Proliferación”, tal y como se usa en esta solicitud, implica la reproducción o multiplicación de formas similares (células) debido a elementos constituyentes (celulares).

“Migración celular”, tal y como se usa en esta solicitud, implica la invasión por las células cancerosas en el tejido circundante y el cruce de la pared del vaso para salir de la vasculatura a órganos distales de la célula cancerosa.

Por “cánceres con migración celular” se quiere decir cánceres que migran por la invasión por las células cancerosas en el tejido circundante y el cruce de la pared del vaso para salir de la vasculatura a órganos distales de la célula cancerosa.

"Cáncer con migración celular no metastásico", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cánceres que no migran a través del sistema linfático o a través de la diseminación hematógena.

Tal y como se usa en la presente memoria, "adhesión célula a célula" se refiere a la adhesión entre al menos dos células a través de una interacción entre una molécula de selectina y un ligando específico de selectina. La adhesión célula a célula incluye la migración celular.

Un "trastorno relacionado con la adhesión celular" se define en la presente memoria como cualquier enfermedad o trastorno que resulta de o está relacionado con la adhesión célula a célula o la migración. Un trastorno de adhesión celular también incluye cualquier enfermedad o trastorno que resulta de la activación inapropiada, aberrante, o anormal del sistema inmune o del sistema inflamatorio. Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, infarto de miocardio, infección bacteriana o viral, afecciones metastásicas, p. ej., cáncer. La invención presenta además métodos para tratar un trastorno de adhesión celular mediante la administración de un agonista de LXR o polipéptido ApoE.

Tal y como se usa en la presente memoria, "células madre del cáncer" o "células iniciadoras del cáncer" se refiere a células cancerosas que poseen características asociadas con células madre normales, específicamente la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares encontrados en una muestra de cáncer particular. Las células madre del cáncer son, por lo tanto, tumorogénicas o formadoras de tumores, quizá a diferencia de otras células cancerosas no tumorogénicas. Las células madre del cáncer pueden persistir en los tumores como una población distinta y causar la recurrencia y metástasis del cáncer dando lugar a nuevos tumores.

Tal y como se usa en la presente memoria, "siembra tumoral" se refiere al escape de agrupaciones de células tumorales y su crecimiento posterior como implantes malignos en un sitio distinto del sitio del tumor original.

Tal y como se usa en la presente memoria, "nódulo metastásico" se refiere a una agregación de células tumorales en el cuerpo en un sitio distinto del sitio del tumor original.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se muestran en la descripción más adelante. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y a partir de las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1. Identificación sistemática de miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p como promotores endógenos de metástasis de melanoma humano (A) Mapa de calor que ilustra los valores de expresión de micromatrices normalizados por varianza de miARN regulados al alza en derivados metastásicos MeWo y A375 independientes respecto a sus células parentales respectivas. Los cambios en la desviación estándar desde la media de cada fila del mapa de calor se indican por el mapa de color. (B) Los miARN que se ha encontrado que están regulados al alza por hibridación en micromatriz se validaron por qRT-PCR en derivados metastásicos MeWo-LM2. n=3. (C) Representación de la análisis de imagen bioluminiscente de la colonización metastásica de pulmón después de la inyección intravenosa de 4×10^4 células MeWo parentales que sobreexpresan los precursores para miR-199a, miR-1908, miR-214, o una horquilla control. Los pulmones se extrajeron 63 días después de la inyección y se tiñeron con H y E. n=5. (D) Representación de la análisis de imagen bioluminiscente y pulmones teñidos con H y E correspondientes a metástasis pulmonares después de la inyección intravenosa de 4×10^4 células LM2 que expresan una horquilla corta (miR-Zip) que inhibe miR-1908 (m1908 KD), miR-199a-3p (m199a3p KD), miR-199a-5p (m199a5p KD), o una secuencia control (shCTRL). Los pulmones se extrajeron y se tiñeron con H y E 49 días después de la inyección n=5-8. (E) La colonización pulmonar por 2×10^5 derivados metastásicos A375-LM3 con silenciamiento inducido por miR-Zip de miR-1908, miR-199a-3p, miR-199a-5p, o una secuencia control se cuantificó en el día 42 por análisis de imagen bioluminiscente. n=5-8 (F) Los niveles de expresión de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 se determinaron de una manera ciega por qRT-PCR en una cohorte de lesiones cutáneas de melanoma primario no metastásicas (n=38) y metastásicas (n=33) de pacientes del MSKCC. n=71. Todos los datos se representan como media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Véase también la Figura 12.

Figura 2. MiR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p presentan papeles duales autónomos de células/no autónomos de células en la regulación de la progresión metastásica de melanoma (A) Se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en ratones inmunodeficientes, y se monitorizó el volumen tumoral primario con el tiempo. n=4-6. (B) Se dejó que 1×10^5 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control invadieran a través de un inserto recubierto con matrigel trans-well durante 24 horas, y se cuantificó el número de células invasoras en el lado basal de cada inserto. n=7. (C-D) Se sometieron 1×10^5 células MeWo-LM2 (C) y A375-LM3 (D) altamente metastásicas con inhibición inducida por miR-Zip de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control al ensayo de invasión celular. n=6-8. (E) Se sembraron 5×10^4 células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en el fondo de un pocillo, y se dejó que 1×10^5 células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) migraran hacia las células cancerosas durante 16 horas a través de un inserto trans-well. Se midió la

capacidad de reclutamiento endotelial cuantificando el número de HUVEC que migraron al lado basal de cada inserto. n=7. (F-G) Reclutamiento endotelial por 5 x 10^4 células MeWo-LM2 (F) y A375-LM3 (G) inhibido para miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control. n=6-10. (H) Representación de la fracción acumulativa del porcentaje de la distribución de la densidad de vasos sanguíneos para nódulos metastásicos formados después de la inyección intravenosa de 2 x 10^5 células MeWo-LM2 altamente metastásicas deplecionadas de miR-199-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control. Las secciones de pulmón se tiñeron doblemente inmunohistoquímicamente para vimentina humana (azul) y MECA-32 (rojo), y se cuantificó el porcentaje de área positiva para MECA-32 en cada nódulo metastásico, demarcada sobre la base de la tinción con vimentina. n=211 nódulos (KD control); n=60 nódulos (KD m199a3p); n=138 nódulos (KD m199a5p); n=39 nódulos (KD m1908). Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm. Véase también la Figura 13.

Figura 3. Identificación de ApoE y DNAJA4 como genes diana comunes de miR-199a y miR-1908 (A) Mapa de calor que representa los niveles de ARNm de ApoE y DNAJA4, medidos por qRT-PCR, en células MeWo poco metastásicas que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control y en células MeWo-LM2 altamente metastásicas. El mapa de color ilustra los cambios en la desviación estándar desde la media de cada columna de mapa de calor. (B) Ensayos del informador luciferasa heterólogo que miden la estabilidad de fusiones de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 de tipo salvaje con luciferasa o fusiones de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 mutante del sitio diana de miARN en células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control. n=3-4. (C) Estabilidad de las fusiones de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 de tipo salvaje con luciferasa en células MeWo-LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control. n=4. (D) Esquema del modelo derivado experimentalmente de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 diana de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908. (E) Actividad luciferasa de fusiones de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 de tipo salvaje con luciferasa y mutante del sitio diana de miARN en derivados MeWo-LM2 altamente metastásicos y su línea celular parental poco metastásica. n=4. (F) Capacidad de invasión en matrigel por 1 x 10^5 células MeWo-LM2 que expresan un vector control o que sobreexpresan ApoE o DNAJA4. n=4. (G) Capacidad de reclutamiento endotelial por 5 x 10^4 células MeWo-LM2 transducidas con un vector control o un vector con sobreexpresión para ApoE o DNAJA4. n=6. (H-I) Se evaluaron células MeWo parentales poco metastásicas transducidas con horquillas cortas lentivirales dirigidas a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control para determinar su capacidad de invasión de matrigel (H) y su capacidad de reclutar células endoteliales (I). n=6-8. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm. Véase también la Figura 14.

Figura 4. La toma como diana directa de ApoE y DNAJA4 por miR-199a y miR-1908 promueve la invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización (A-D) Se sometieron células LM2 altamente metastásicas que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a ApoE o DNAJA4 en el contexto de la inhibición de miR-1908 (KD m1908; A, B) o inhibición de miR-199a-5p (KD m199a5p; C, D) a ensayos de invasión celular (A, C) y reclutamiento endotelial (B, D). n=6-8. (E-F) Representación de análisis de imagen bioluminiscente y tinción con H y E de pulmones representativos de metástasis pulmonar después de la inyección intravenosa de 1 x 10^5 células LM2 que expresan una horquilla control u horquillas dirigidas a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control en el entorno del silenciamiento de miR-1908 (E) o silenciamiento de miR-199a-5p (F). n=5. (G-H) Se analizaron células MeWo parentales que sobreexpresan ApoE o DNAJA4 o que expresan un vector control en el contexto de la sobreexpresión de miR-1908 para determinar los fenotipos de invasión de matrigel (G) y reclutamiento endotelial (H). (I-J) Se transdujeron derivados A375-LM3 que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a ApoE y DNAJA4 con una mezcla de LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 o un LNA control y se analizaron en los ensayos de invasión de matrigel (I) y reclutamiento endotelial (J). n=4. (K) Distribución de la densidad de los vasos sanguíneos, representada en un gráfico de fracción acumulativa, para nódulos metastásicos formados por células MeWo-LM2 inhibidas para miR-1908 y transducidas con ARNsh dirigidos a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control. Las secciones pulmonares de la Figura 4E se tiñeron doblemente inmunocitoquímicamente para vimentina humana (azul) y el marcador endotelial MECA-32 (rojo). Se cuantificó el porcentaje de área positiva para MECA-32 en cada nódulo positivo para vimentina. n=39 nódulos (shCTRL); n=97 (shAPOE^1); n=38 (shAPOE^2); n=200 (DNAJA4sh^1); n=19 (DNAJA4sh^2). Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm. Véase también la Figura 15.

Figura 5. La ApoE secretada por células de melanoma inhibe la invasión de melanoma y el reclutamiento endotelial, mientras la deleción genética de ApoE acelera la metástasis (A-B) Niveles de ApoE extracelular cuantificados por ELISA en medio condicionado de derivados MeWo-LM2 metastásicos y sus células parentales (A) y células LM2 silenciadas para miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control (B). n=3. (C) Se añadió anticuerpo neutralizante de ApoE 1D7 (10-40 µg/ml) o IgG (40 µg/ml) al medio celular, y se evaluó la invasión de matrigel por las células MeWo parentales. n=4-6. (D) Reclutamiento endotelial por células MeWo parentales en presencia de 1D7 (40 µg/ml) o un anticuerpo IgG control (40 µg/ml). n=4. (E) Los fenotipos de invasión de matrigel y reclutamiento endotelial se evaluaron en células LM2 en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) (100 µM) o ApoE3 recombinante (100 µM) añadidos al medio celular. n=7-10. (F-G) Se examinaron células LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control para determinar su capacidad de invasión de matrigel (F) y capacidad de reclutamiento endotelial (G) en presencia de anticuerpos IgG o neutralizante de ApoE 1D7 (40 µg/ml). n=5-6. (H) Niveles de ApoE cuantificados por ELISA en medio condicionado de células MeWo parentales transducidas con ARNsh dirigidos a DNAJA4 o una secuencia control. n=3. (I-J) Se analizaron células MeWo parentales con silenciamiento inducido por ARNsh de DNAJA4 para determinar los fenotipos de invasión de matrigel (I) y reclutamiento endotelial (J) en presencia bien de BSA (100 µM) o ApoE3 recombinante (100 µM). n=4. (K) Niveles de expresión de

ApoE basados en matriz en muestras de nevi (n=9), melanomas primarios (n=6), y metástasis de melanoma distantes (n=19). (L) Se incubaron células MeWo-LM2 altamente metastásicas en presencia de ApoE3 recombinante o BSA a 100 µg/ml. Después de 24 horas, se inyectaron por vía intravenosa 4 x 10^4 células en ratones NOD-SCID, y se monitorizó la colonización pulmonar por análisis de imagen bioluminiscente. n=6. (M) Metástasis pulmonares por 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6 con anulación genética de ApoE o sus compañeros de camada control de tipo salvaje. La cuantificación de la bioluminiscencia pulmonar y los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden a 19 días después de la inyección. n=8-18. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm.

Figura 6. Identificación de receptores de células de melanoma y endoteliales distintos que median los efectos de ApoE en la invasión y el reclutamiento endotelial del melanoma (A) Se examinó la capacidad de invasión de matrigel en 1 x 10^5 células LM2 transducidas con ARNsi dirigidos a LDLR, VLDLR, LRP8, LRP1, o una secuencia control en presencia bien de BSA (100 µM) o ApoE3 recombinante (100 µM). n=4-7. (B) Se transfectaron 1 x 10^5 células MeWo-LM2 transducidas con horquillas cortas dirigidas a miR-1908 o una secuencia control con ARNsi dirigidos a LRP1 o un ARNsi control y se sometieron al ensayo de invasión de matrigel. n=4. (C) Análisis de imagen bioluminiscente de colonización pulmonar por 1 x 10^5 células LM2 transducidas con ARNsi dirigidos a LRP1 o una secuencia control en el entorno de la inhibición de miR-1908. n=5. (D) Se analizaron 1 x 10^5 células endoteliales preincubadas con BSA (100 µM) o ApoE3 recombinante (100 µM) durante 24 horas para determinar el fenotipo de reclutamiento endotelial por 5 x 10^5 células LM2. n=3-4. (E) Se transdujeron 1 x 10^5 células endoteliales con ARNsi dirigidos a LDLR, VLDLR, LRP1, LRP8, o una secuencia control y se dejó que migraran en un sistema trans-well hacia células LM2 inhibidas para miR-1908 o una secuencia control. n=4-12. (F) Migración trans-well por 1 x 10^5 células endoteliales en presencia de anticuerpos IgG (40 µg/ml) o 1D7 (40 µg/ml) añadidos al medio celular. n=6-8. (G) Migración trans-well por 1 x 10^5 células endoteliales transducidas con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control en presencia de BSA (100 µM) o ApoE3 recombinante (100 µM). n=6-7. (H) Se transdujeron 1 x 10^5 células endoteliales con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control, y se evaluó la migración quimiotáctica trans-well a lo largo de un gradiente de ApoE. n=6-8. (I) Reclutamiento endotelial en tapones de matrigel, implantados por vía subcutánea por encima del flanco ventral de ratones, que contenían BSA (10 µg/ml), VEGF (400 ng/ml) + BSA (10 µg/ml), o VEGF (400 ng/ml) + ApoE3 recombinante (10 µg/ml). n=3-6. (J) Densidad de los vasos sanguíneos en nódulos metastásicos pulmonares formados después de la inyección intravenosa de 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10 en ratones de tipo salvaje o anulados genéticamente para ApoE. Las secciones pulmonares de la Figura 5M se tiñeron inmunohistoquímicamente para MECA-32, y se cuantificó el porcentaje del área positiva para MECA- 32 en cada nódulo metastásico, indicado sobre la base de la pigmentación celular. n= 17-20. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm.

Figura 7. Cooperatividad clínica y terapéutica entre miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 en metástasis de melanoma (A-D). Curvas de Kaplan-Meier para la cohorte de MSKCC (N=71) que representa la supervivencia sin metástasis de pacientes como una función de sus niveles de expresión de miR-199a-3p (A), miR-199a-5p (B), miR-1908 (C), o agregado de tres miARN de lesiones de melanoma primario (D). Los pacientes cuyos niveles de expresión de miARN o expresión de miARN agregado (suma de los valores de expresión de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908) en los tumores primarios fueron mayores de la mediana para la población se clasificaron como positivos para la expresión de miARN (rojo), mientras aquellos cuyos tumores primarios expresaban los miARN dados a un nivel por debajo de la mediana se clasificaron como negativos para la expresión de miARN (azul). (E) Metástasis pulmonares por células LM2 altamente metastásicas transfectadas con LNA dirigidos individualmente a cada miR-1908, miR-199a-3p, o miR-199a-5p, una combinación de LNA dirigida a todos los tres miARN, o un LNA control. 48 horas después de la transfección, se inyectaron por vía intravenosa 1 x 10^5 células en ratones inmunodeficientes. n=5-6. (F) Metástasis sistémicas por 1 x 10^5 células MeWo-LM2 transfectadas con un LNA control (LNA-CTRL) o una mezcla de LNA dirigida a miR-1908, miR-199a-3p, miR-199a-5p (miARN LNA-3) 48 horas antes de la inyección intracardiaca en ratones desnudos atímicos. n=5. (G) Número de foci metastásicos sistémicos que surgen de células LM2 con miARN de LNA-CTRL y LNA-3 en el día 28 después de la inyección intracardiaca. n=5. (H-I) Cuantificación de la señal de bioluminiscencia de metástasis óseas (H) y metástasis cerebrales (I) en el día 28 después de la inyección intracardiaca de células LM2 con miARN de LNA-CTRL y LNA-3. n=5. (J) Se inyectaron en la vena de la cola 4 x 10^4 células MeWo-LM2 altamente metastásicas en ratones inmunocomprometidos, y los ratones se trataron por vía intravenosa con una mezcla de LNA optimizados *in vivo* dirigidos a miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p a una dosis total de 12,5 mg/kg o un control de PBS simulado en una base bisemanal durante cuatro semanas. La colonización pulmonar se evaluó por análisis de imagen bioluminiscente, y se muestran los pulmones teñidos con H y E representativos extraídos en el día 56. n=5-6. (K) Modelo de regulación dependiente de miARN de invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización en melanoma a través del direccionamiento de la señalización del receptor LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales mediada por ApoE.

Figura 8. La toma como diana de la señalización de ApoE/LRP1 dependiente de miARN promueve la invasión de células cancerosas y el reclutamiento endotelial a través de la inducción de CTGF. (A) Un mapa de calor de los niveles de expresión de CTGF normalizado por varianza, determinado por análisis por qRT-PCR, en (1) células MeWo parentales y células MeWo-LM2, (2) células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control, y (3) células MeWo parentales transducidas con horquillas cortas dirigidas a ApoE o una secuencia control. El mapa de color indica el cambio de las desviaciones estándar de la media. (B) Niveles de CTGF en medio condicionado de células MeWo parentales con inactivación de ApoE determinados por ELISA. n=6; valores p basados

en un ensayo de la t de student de una vía. (C) Niveles de CTGF, cuantificados por ELISA, en medio condicionado de células MeWo-LM2 altamente metastásicas tratadas con ApoE recombinante en el entorno de inactivación de LRP1 o un control de inactivación. n=3-4; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. (D-E) Las células MeWo parentales con inactivación de ApoE inducida por ARNsh se (1) transfectaron con ARNsi independientes dirigidos a CTGF o una secuencia control o (2) incubaron en presencia de un anticuerpo neutralizante de CTGF (20 µg/ml) o un anticuerpo IgG control (20 µg/ml), y las células se sometieron a ensayos de invasión celular (D) y reclutamiento endotelial (E). n=6-8; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía; la barra de escala indica 100 µM. Todos los datos se representan como media + SEM.

Figura 9. CTGF media la invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización dependiente de miARN. (A) Se sometieron 1 x 10^5 células MeWo parentales que expresan una horquilla control o que sobreexpresan miR-199a o miR-1908 a un ensayo de invasión celular trans-well en presencia de un anticuerpo bloqueante dirigido a CTGF (20 µg/ml) o un anticuerpo IgG control (20 µg/ml) como se indica en la figura. n=4-10; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. Todos los datos se representan como media ± SEM. (B) Reclutamiento endotelial por células MeWo parentales que expresan una horquilla control o que sobreexpresan miR-199a o miR-1908. Al comienzo del ensayo, se añadieron un anticuerpo neutralizante dirigido a CTGF (20 µg/ml) o un anticuerpo IgG control (20 µg/ml) a las células endoteliales como se indica, y se dejó que 1 x 10^5 células endoteliales migraran hacia 5 x 10^4 células cancerosas en un ensayo de migración trans-well. n=3-8; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. (C) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por 5 x 10^4 células MeWo parentales inactivadas para CTGF en el entorno de sobreexpresión de miR-199a o miR-1908. n=5-6; valores p obtenidos usando un ensayo de la t de Mann-Whitney de una vía. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 10. El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 eleva los niveles de ApoE de las células de melanoma y suprime la invasión de células cancerosas, el reclutamiento endotelial, y la colonización metastásica. (A-B) Se incubaron células MeWo parentales en presencia de DMSO o GW3965 a las concentraciones indicadas. Después de 48 horas, se extrajo el ARN total, y se determinaron los niveles de ApoE (A) y DNAJA4 (B) por qRT-PCR. n=3. (C) Invasión celular por 1 x 10^5 células MeWo parentales pretratadas con GW3965 o DMSO durante 48 horas. n=6-7. valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. Todos los datos se representan como media ± SEM. (D) Reclutamiento endotelial por 5 x 10^4 células MeWo parentales pretratadas con GW3965 o DMSO durante 48 horas. n=6-7. valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. (E) Los ratones se alimentaron con dieta de pienso basado en grano que contenía GW3965 (20mg/kg) o una dieta control. Después de 10 días, se inyectaron 4 x 10^4 células MeWo parentales en la vena de la cola en ratones, y los ratones se alimentaron continuamente con pienso que contenía GW3965 o una dieta control durante todo el experimento. Se evaluó la colonización pulmonar por análisis de imagen bioluminiscente. n=5-6; valores p obtenidos usando un ensayo de la t de Mann-Whitney de una vía Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 11. Identificación de miR-7 como un supresor endógeno de metástasis de melanoma. (A) Gráfico de análisis de imagen bioluminiscente de colonización metastásica pulmonar después de la inyección intravenosa de 4 x 10^4 células MeWo parentales que expresan una horquilla corta (miR-Zip) que inhibe miR-7 (miR-7 KD). Los pulmones se extrajeron 63 días después de la inyección y se tiñeron con H y E. n=5. (B). Metástasis pulmonar por 4 x 10^4 células LM2 que sobreexpresan el precursor para miR-7 o una horquilla control. La colonización pulmonar se monitorizó semanalmente por análisis de imagen bioluminiscente, y los pulmones se extrajeron en el día 77 después de la inyección. n=5. Todos los datos se representan como media ± SEM; los valores p se determinaron usando un ensayo de la t de Mann-Whitney de una vía. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 12. Selección *in vivo* de derivados de líneas celulares de melanoma humano altamente metastásicas e identificación de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 como miARN promotores de metástasis (A-B) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares e imágenes representativas de pulmones teñidos con H y E correspondientes a derivados metastásicos MeWo-LM2 (A) y A375-LM3 (B) y sus líneas celulares parentales representativas. Se inyectaron por vía intravenosa 4 x 10^4 células MeWo-Par/MeWo-LM2 y 1 x 10^5 células A375-Par/A375-LM3 en ratones NOD-SCID, y se extrajeron los pulmones y se tiñeron con H y E en el día 72 y día 49, respectivamente. n=4-5. (C) Se determinaron los niveles de expresión de miR-199a-5p, miR-199a-3p, miR-1908, y miR-214 por qRT-PCR en derivados metastásicos A375-LM3 y sus células parentales. n=3. (D) Se transdujeron células MeWo parentales con retrovirus que expresan una horquilla control o una construcción de horquilla de pre-miARN dando lugar a miR-199a (ambos miR-199a-3p y miR-199a-5p), miR-1908, o miR-214. Se determinaron los niveles de expresión de los miARN diana por qRT-PCR. n=3. (E) Se analizaron secciones de pulmón teñidas con H y E de la Figura 1C para determinar el número de nódulos metastásicos que resultan de células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control. n=3. (F) Se analizó el número de nódulos metastásicos formados por células LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control en secciones de pulmones teñidas con H y E de la Figura 1D. n=3. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 13. MiR-199a y miR-1908 inhiben la proliferación *in vitro* y promueven selectivamente la invasión celular y el reclutamiento endotelial (A) Se sembraron 2,5 x 10^4 células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en triplicado, y se contaron las células viables después de 5 días. n=3. (B) Se compararon 1 x 10^5 células MeWo parentales poco metastásicas y células LM2 altamente metastásicas para determinar su capacidad de

invadir a través de matrigel en un ensayo trans-well. n=3-4. (C) Se sembraron 1 x 10^5 células endoteliales en una placa de 6 pocillos y se dejó que formaran una monocapa. Se sembraron 2 x 10^5 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en la parte superior de la monocapa endotelial y se incubó durante 30 minutos. Cada monocapa se sometió posteriormente a análisis de imagen, y se cuantificó el número de células cancerosas que se adhirieron a las células endoteliales. n=3. (D) Se sembraron 1 x 10^6 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en placas con baja adherencia que contenían medio celular suplementado con metilcelulosa al 0,2 %. Después de 48 horas en suspensión, se cuantificaron los números de células muertas y viables. n=3. (E) Se sembraron 5 x 10^5 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en una placa de 6 pocillos y se incubó en medio con bajo contenido en suero durante 48 horas, después de lo cual se cuantificó el número de células viables. n=4. (F) Formación de colonias por células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control. Se sembraron 50 células en una placa de 6 cm, y se cuantificó el número de colonias formadas 2 semanas después. n=4. (G) Se sembraron 5 x 10^4 células MeWo parentales y LM2 en la parte inferior de un pocillo y se evaluó su capacidad de reclutar células endoteliales. n=6-8. (H) Porcentaje de densidad de vasos sanguíneos, mostrado como una representación de fracción acumulativa, para nódulos metastásicos formados por células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control. Las secciones pulmonares de la Figura 1C se tiñeron doblemente inmunohistoquímicamente para vimentina humana y MECA-32, y se cuantificó el área positiva para MECA-32 respecto al área total del nódulo, proporcionada por la tinción con vimentina humana, usando ImageJ. n=43 nódulos (control); n=117 nódulos (miR-199a OE); n=55 nódulos (miR-1908 OE). Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm.

Figura 14. MiR-199a y miR-1908 de manera convergente y cooperativa toman como diana ApoE y DNAJA4 (A) Diagrama Venn que muestra la estrategia experimental integradora que da lugar a la identificación de genes diana potenciales comunes para miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908. El perfilado transcriptómico de genes regulados a la baja más de 1,5 veces después de la sobreexpresión de cada miARN se superpuso con genes regulados al alza más de 1,5 veces después del silenciamiento de cada miARN y con genes regulados a la baja más 1,5 veces en células LM2 metastásicas respecto a su línea celular parental. (B-D) Niveles de expresión de ApoE y DNAJA4 medidos por qRT-PCR en células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control (B), en células MeWo parentales y su línea celular derivada LM2 altamente metastásica (C), y en células MeWo-LM2 con silenciamiento basado en miR-Zip de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control (D). n=3. (E) Ensayos de informador luciferasa heterólogo que miden la estabilidad de fusiones de 3'UTR/CDS de ApoE y DNAJA4 mutante en el sitio diana de miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908 con luciferasa en células LM2 altamente metastásicas con inhibición de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control. n=3-4. (F) Se transdujeron células MeWo-LM2 con retrovirus que expresan un vector control o un vector de sobreexpresión dando lugar a ApoE o DNAJA4. Se determinaron los niveles de expresión de los genes diana por qRT-PCR. (G) Los niveles de expresión de ApoE y DNAJA4, determinados por qRT-PCR, en células MeWo parentales se transdujeron con ARNsh lentivirales dirigidos a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 15. Interacciones epistáticas entre miR-199a/miR-1908 y ApoE/DNAJA4 (A-D). Se transdujeron células MeWo-LM2 con ARNsh lentivirales dirigidos a ApoE (A, C), DNAJA4 (B, D), o un ARNsh control en el entorno de silenciamiento inducido por miR-Zip de miR-1908 (A, B), miR-199a-5p (C, D), o una secuencia control. Los niveles de los genes diana se analizaron por qRT-PCR. (E) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por 1 x 10^5 células LM2 que expresan una horquilla control o ARNsh (independientes de los ARNsh usados en la Figura 4E) dirigidos a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control en el entorno de la inhibición de miR-1908. Imágenes bioluminiscentes representativas y pulmones teñidos con H y E correspondientes al día 42 después de la inyección. n=5. (F-G) Los niveles de expresión de ApoE y DNAJA4 se analizaron por qRT-PCR en células MeWo parentales transducidas con retrovirus que expresan un vector control o un vector de sobreexpresión para ApoE o DNAJA4 en el entorno de la sobreexpresión de miR-1908 (F) o miR-199a (G). (H-I). Se examinaron células MeWo parentales que sobreexpresan ApoE o DNAJA4 o que expresan un vector control en el entorno de la sobreexpresión de miR-199a para determinar los fenotipos de invasión (H) y reclutamiento endotelial (I). n=7-8. (J) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por 4 x 10^4 células MeWo parentales que sobreexpresan ApoE o DNAJA4 o que expresan un vector control en el entorno de la sobreexpresión de miR-1908. Imágenes bioluminiscentes representativas y pulmones teñidos con H y E correspondientes al día 56 después de la inyección n=4-8. (K). Niveles de expresión de ApoE y DNAJA4, determinados por qRT-PCR, en derivados A375-LM3 altamente metastásicos transducidos con lentivirus que expresan construcciones de ARNsh dirigidas a ApoE y DNAJA4 o una secuencia control. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm.

Figura 16. La ApoE extracelular inhibe los fenotipos de invasión y reclutamiento endotelial de melanoma independientemente de cualquier efecto en la proliferación y supervivencia de las células cancerosas o endoteliales (A) Se midieron los niveles extracelulares de ApoE por ELISA en medio condicionado de células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control. n=3. (B-C) Se cultivaron 3 x 10^4 células MeWo-LM2 (B) o células endoteliales (C) en presencia de BSA (100 µM) o APOE (100 µM), y se monitorizó la proliferación celular con el tiempo mediante el recuento del número de células viables en cada punto de tiempo indicado. n=3. (D-E) Supervivencia de células MeWo-LM2 (D) o células endoteliales (E) en el contexto de privación de suero en presencia de BSA (100 µM) o APOE (100 µM). n=3. (F-G) Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de ApoE en células

MeWo parentales transducidas con lentivirus que expresa una horquilla control o construcciones de horquilla corta dirigidas a DNAJA4 (F) y en células LM2 transducidas con retrovirus que expresan un vector control o un vector de sobreexpresión para DNAJA4 (G). n=3. (H-I) Se evaluaron las células LM2 transducidas con retrovirus que expresa un vector control o un vector de sobreexpresión para DNAJA4 para determinar su capacidad de invadir a través de matrigel (H; n=6-8) y reclutar células endoteliales en un ensayo trans-well (I; n=4) en presencia de anticuerpos IgG (40 µg/ml) o neutralizante de ApoE 1D7 (40 µg/ml). Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 17. ApoE inhibe la invasión celular y el reclutamiento endotelial por la toma como diana de los receptores LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales (A) Se analizaron 1 x 10^5 células LM2 transducidas con ARNsi frente a LRP1 o una secuencia control para determinar su capacidad de invadir a través de matrigel. n=9-12. (B) Se transfectaron 1 x 10^5 células MeWo-LM2 inhibidas para miR-199a-5p o una secuencia control con ARNsi dirigidos a LRP1 o un ARNsi control y se examinaron para determinar su capacidad de invasión de matrigel. n=4. (C) Pulmones teñidos con H y E representativos extraídos en el día 56 de ratones NOD-SCID a los que se inyectó células MeWo-LM2 miR-1908 KD transducidas con un ARNsi control o ARNsi dirigidos a LRP1 (Véase la Figura 6C). (D-E) Se transfectaron 1 x 10^5 células endoteliales con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control y se dejó que migraran en trans-well hacia 5 x 10^4 células MeWo-LM2 que expresan una horquilla corta control (D; n=8) o 5 x 10^4 células MeWo-LM2 inhibidas para miR-199a-5p o una secuencia control (E; n=4). Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 100 µm.

Figura 18. La inhibición basada en LNA de miR-199a y miR-1908 suprime las metástasis de melanoma (A) Proliferación celular *in vitro* de 2,5 x 10^4 células MeWo-LM2 transducidas con un LNA control o una mezcla de LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR199a-5p y miR-1908. Se cuantificó el número de células viables después de cinco días. n=3. (B) Colonización pulmonar por derivados A375-LM3 altamente metastásicos transfectados con un LNA control o una mezcla de LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR199a-5p, y miR-1908. 48 horas después de la transfección, se inyectaron por vía intravenosa 5 x 10^5 células en ratones NOD-SCID, y se determinó la colonización pulmonar mediante la medición de bioluminiscencia 35 días después. n=5-6. (C) El peso de los ratones tratados con una mezcla de LNA dirigidos a los tres miARN o un tratamiento control con PBS simulado (Figura 7J) se monitorizó 2 veces por semana. n=5-6. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 19. La activación de la señalización de LXRβ suprime la invasión celular y reclutamiento endotelial del melanoma. (A) Mapa de calor que representa los niveles de expresión basados en micromatriz de las isoformas *LXR* y *RXR* en la colección de líneas celulares de melanoma NCI-60. El mapa de calor para estos genes se extrae del mapa de calor mayor de la familia de receptores de hormonas nucleares (Figura 20). La clave del mapa de color indica el cambio en las desviaciones estándar para el valor de la expresión de cada receptor respecto al valor de expresión promedio de todos los genes perfilados en la micromatriz (> 39.000 variantes de transcritos) en cada línea celular. (B) Invasión celular por las células de melanoma humano 1 x 10^5 MeWo, 5 x 10^4 HT-144, 5 x 10^5 SK-Mel-2, y 5 x 10^4 SK-Mel-334.2. Las células se trataron con DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM durante 72 horas y se sometieron a un ensayo de invasión de matrigel en trans-well. n=4-8. (C) Se ensayaron las células de melanoma humano 5 x 10^4 MeWo, HT-144, SK-Mel-2, y SK- Mel-334.2 para determinar su capacidad de reclutar 1 x 10^5 células endoteliales en un ensayo de migración trans-well, después del tratamiento de las células de melanoma con DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM durante 72 horas. n=4-8. (D-E) Se sometieron las células de melanoma 1 x 10^5 MeWo (D) y 1 x 10^5 HT-144 (E) que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXRα* o *LXRβ* al ensayo de invasión celular después del tratamiento de las células con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas. n=4-12. (F-G) Se trataron las células 5 x 10^4 MeWo (F) y 5 x 10^4 HT-144 (G), transducidas con ARNsh lentivirales dirigidos a *LXRα* o *LXRβ* o un ARNsh control, con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas y se ensayaron para determinar su capacidad de reclutar 1 x 10^5 células endoteliales en un ensayo de migración trans-well. n=7-8. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 50 µm. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Figura 20. Análisis de la expresión de receptores hormonales nucleares en melanoma y efectos de agonistas de LXR y RXR en el crecimiento celular *in vitro*, relacionado con la Figura 19(A-G). (A) Mapa de calor que muestra los niveles de expresión basados en micromatriz de todos los miembros de la familia de receptores hormonales nucleares a lo largo de la colección NCI-60 de líneas de melanoma. Los niveles de expresión de cada receptor se presentan como el número de desviaciones estándar por debajo o por encima de los niveles de expresión promedio de todos los genes (> 39.000 variantes de transcritos) detectados por la micromatriz en cada línea celular respectiva. (B) Se sembraron las células de melanoma humano 2,5 x 10^4 MeWo, HT-144, o SK-Mel-334.2 en placas de 6 pocillos y se cultivaron en presencia de DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM. Las células viables se contaron en el día 5 posterior a la siembra. n=3-6. (C) Se sembraron en placas 2,5 x 10^4 células MeWo, HT-144, o SK-Mel-334.2 en triplicado y se incubaron en medio que contenía DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM durante 5 días, después de lo cual se cuantificó el número de células muertas usando la tinción de células muertas de azul de tripán. n=3. (D-G) Expresión relativa de *LXRα* y *LXRβ*, determinada por qRT-PCR, en células de melanoma humano MeWo (D, E) y HT-144 (F, G) que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXRα* o *LXRβ*. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 21. La activación terapéutica de LXR inhibe el crecimiento tumoral del melanoma. (A-B) Crecimiento tumoral primario por 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas por vía subcutánea en ratones C57BL/6-WT.

Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (20 mg/kg/día o 100 mg/kg/día) (A) o T0901317 (20 mg/kg/día) (B). Las imágenes tumorales representativas mostradas corresponden a tumores extraídos en el día final (d12). n=10-18 (A), 8-10 (B). (C-E) Crecimiento tumoral primario por las células de melanoma humano 1 x 10^6 MeWo (C), 7,5 x 10^5 SK-Mel-334.2 (D), y 2 x 10^6 SK-Mel-2 (E) inyectadas por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg o 100 mg/kg, según se indica). Las imágenes tumorales mostradas corresponden al último día de mediciones. n=6-34 (C), 8 (D), 5 (E). (F) Se inyectaron por vía subcutánea 5 x 10^4 células B16F10 en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta 150 mm^3, los ratones se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (150 mg/kg), y el crecimiento tumoral se midió diariamente. n=6-13. (G-I) Supervivencia global de los ratones después del injerto subcutáneo de las células 5 x 10^4 B16F10 (G), 1 x 10^6 MeWo (H), y 7,5 x 10^5 SK-Mel-334.2 (I) en ratones a los que se administró un pienso normal o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg) después de la formación de los tumores que tenían un volumen de 5-10 mm^3. n=6-9 (F), 4-7(H), 3-6 (I). (J-L) Densidad de las células endoteliales tumorales, determinada por tinción inmunohistoquímica para el antígeno de células endoteliales de ratón MECA-32 (J), proliferación de las células tumorales, determinada por tinción para el marcador proliferativo Ki-67 (K), y apoptosis de las células tumorales, determinada por tinción para caspasa-3 escindida (L), en tumores de melanoma subcutáneos formados por 1 x 10^6 células de melanoma humano MeWo en respuesta al tratamiento de los ratones con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 35 días. n=5. El volumen tumoral se calculó como (diámetro pequeño)^2 x (diámetro grande)/2. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escalas, 5 mm (A-D), 50 µm (J, K), 25 µm (L).

Figura 22. El agonismo de LXRβ suprime el crecimiento tumoral de melanoma, relacionado con la Figura 21(A-E). (A) Mediciones de peso de ratones alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg/día o 100 mg/kg/día) o T0901317 (20 mg/kg) durante 65 días. n=5-6.

Figura 23. El agonismo de LXR suprime las metástasis de melanoma al pulmón y cerebro. (A) Se pretrataron células MeWo con DMSO o GW3965 (1 µM) durante 48 horas y se inyectaron por vía intravenosa 4 x 10^4 células a través de la vena de la cola en ratones NOD Scid. La colonización pulmonar se monitorizó por análisis de imagen bioluminiscente semanalmente. Se muestran los pulmones teñidos con H y E representativos que corresponden al día final (d70). n=4-5. (B-C) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por 4 x 10^4 células MeWo inyectadas por vía intravenosa en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (20 mg/kg) o T0901317 (20 mg/kg) empezando 10 días antes de la inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de análisis de imagen n=5-6. (B-C) Análisis de imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por 4 x 10^4 células MeWo inyectadas por vía intravenosa en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (20 mg/kg) o T0901317 (20 mg/kg) empezando 10 días antes de la inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de análisis de imagen n=5-6. (F) Flujo fotónico sistémico y cerebral después de la inyección intracardiaca de 1 x 10^5 células derivadas de metástasis cerebral MeWo en ratones desnudos atímicos que se alimentaron con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) empezando el día 0 después de la inyección. n=7. (G) Esquema del modelo de metástasis ortotópica experimental usado para evaluar la capacidad del tratamiento con GW3965 de suprimir las metástasis pulmonares después de la escisión del tumor. (H) Flujo fotónico pulmonar *ex vivo*, determinado por análisis de imagen bioluminiscente, en ratones NOD Scid a los que se administró un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (100 mg/kg) durante 1 mes después de la escisión de tumores de melanoma subcutáneos con tamaño concordante (~300 mm^3 de volumen) formados por 1 x 10^6 células de melanoma MeWo. También se muestran los pulmones representativos teñidos para vimentina humana. n=7-9. (I) Se inyectaron por vía intravenosa 4 x 10^4 células MeWo en ratones NOD Scid. Después del inicio de las metástasis, detectadas por análisis de imagen bioluminiscente en d42, se administró a los ratones una dieta control o una dieta con GW3965 (100 mg/kg) como se indica, y se midió semanalmente la progresión de la colonización pulmonar. n=6. (J) Número de nódulos metastásicos macroscópicos en pulmones teñidos con H y E extraídos en el día final (d77) de ratones NOD Scid a los que se administró una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg), como se indica en (I). n=4-5. (K) Supervivencia global de los ratones después de la inyección intravenosa de 4 x 10^4 células MeWo en ratones NOD-Scid que se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (20 mg/kg) empezando 10 días antes de la inyección de las células cancerosas. n=5-6. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Figura 24. Supresión de la progresión de melanoma dirigida genéticamente por terapia de activación de LXR. (A) Supervivencia global de ratones C57BL/6 *Tyr::CreER; Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{lox/+}$* después de la inducción de melanoma general por la administración intraperitoneal de 4-HT (25 mg/kg) en tres días consecutivos. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). n=10-11. (B) Carga de tumor de melanoma, expresada como el porcentaje de área de la piel dorsal, medida en el día 35 en ratones *Tyr::CreER; Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{lox/lox}$* a los que se administró un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg) después de la inducción del melanoma como se describe en (A). n=4-5. (C) Número de nódulos metastásicos macroscópicos en los nódulos linfáticos de la glándula salivar detectados post-mortem en ratones *Tyr::CreER; Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{lox/lox}$* que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (100 mg/kg) después de la inducción global de la progresión del melanoma como se describe en

(A). n=7-8. (D) Crecimiento tumoral después de la inyección subcutánea de 1 x 10^5 células de melanoma primario *Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{-/-}$; CDKN2A$^{-/-}$* en ratones C57BL/6-WT singénicos. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se alimentaron con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg). n=16-18. (E) Supervivencia global de ratones C57BL/6-WT a los que se inyectaron por vía subcutánea 1 x 10^5 células de melanoma *Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{-/-}$; CDKN2A$^{-/-}$* y se trataron con una dieta con GW3965 (100 mg/kg) o una dieta control después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3. n=7-8. (F) Colonización pulmonar por 1 x 10^5 células de melanoma primario *Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{-/-}$; CDKN2A$^{-/-}$* inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6-WT. Inmediatamente después de la inyección de las células cancerosas, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) para el resto del experimento. n= 14-15. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 2 mm (B), 5 mm (D).

Figura 25. Supresión mediada por LXR de la progresión del melanoma en un modelo de melanoma en ratón dirigido genéticamente, relacionado con la Figura 24 (A-C). (A) Supervivencia global de ratones C57BL/6 *Tyr::CreER; Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{lox/lox}$* después de la inducción de melanoma general por administración intraperitoneal de 4-HT (25 mg/kg) en tres días consecutivos. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). n=7. (B) Imágenes representativas de ratones C57BL/6 *Tyr::CreER; Braf$^{V600E/+}$; Pten$^{lox/lox}$* alimentados con una dieta control o dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) tomada 43 días después de la inducción del melanoma por administración intraperitoneal de 4-HT.

Figura 26. Una lista de los 50 genes más regulados al alza en células de melanoma humano MeWo en respuesta al tratamiento con GW3965.

Figura 27. La activación de LXRβ induce la expresión de *ApoE* en células de melanoma; ApoE media la supresión dependiente de LXRβ de los fenotipos de la progresión del melanoma *in vitro*. (A- C) Se trataron células de melanoma humano MeWo (A), HT-144 (B), y WM-266-4 (C) con GW3965 o T0901317 a las concentraciones indicadas durante 48 horas, y los niveles de expresión de *ApoE* se analizaron por qRT-PCR. n=3. (D) Niveles extracelulares de proteína ApoE, cuantificados por ELISA, en medio condicionado sin suero recogido de células de melanoma humano HT-144 tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas. n=3-4. (E-F) Se ensayaron 5 x 10^4 células HT-144, tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas, para determinar los fenotipos de invasión celular (E) y reclutamiento endotelial (F) en presencia de un anticuerpo neutralizante de ApoE (1D7) o un anticuerpo IgG control añadidos a 40 µg/ml a cada trans-well al inicio del ensayo. n=4. (G-H) Invasión celular (G) y reclutamiento endotelial (F) por 1 x 10^5 y 5 x 10^4 células MeWo, respectivamente, que expresan un ARNsh control o un ARNsh dirigido a *ApoE* y tratadas con DMSO o GW3965 a 1 µM durante 72 horas antes de cada ensayo. n=7-8. (I- J) Expresión relativa de *ApoE*, cuantificada por qRT- PCR, en células MeWo (I) y HT-144 (J) transducidas con un ARNsh control o un ARNsh dirigido a *LXRα o LXRβ* y tratadas posteriormente con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 48 horas. n=3-9. (K) Niveles extracelulares de la proteína ApoE, medidos por ELISA, en medio condicionado sin suero recogido de células HT-144 transducidas con un ARNsh control o un ARNsh dirigido a *LXRα o LXRβ* y tratadas con DMSO o GW3965 a 1 µM durante 72 horas. n=3. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 50 µm.

Figura 28. La activación de LXRβ suprime la invasión y el reclutamiento endotelial del melanoma mediante el aumento transcripcional de la expresión de *ApoE* en las células de melanoma. (A) La actividad luciferasa accionada por el promotor de *ApoE* fusionado en 3' de las secuencias del elemento multipotenciador 1 (ME. 1) o del elemento multipotenciador 2 (ME.2) y transfectado en células MeWo tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 24 horas. n= 4-8. (B) Los niveles extracelulares de la proteína ApoE se cuantificaron por ELISA en medio condicionado sin suero recogido de células MeWo tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas. n=3-4. (C) Invasión celular por 1 x 10^5 células MeWo pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas. Al inicio del ensayo, se añadió un anticuerpo neutralizante de ApoE (1D7) o un anticuerpo IgG control a 40 µg/ml a cada trans-well, como se indica. n=7-8. (D) Se ensayaron 5 x10^4 células MeWo, pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 µM durante 72 horas, para determinar su capacidad de reclutar 1 x 10^5 células endoteliales en presencia de los anticuerpos 1D7 o IgG a 40 µg/ml. n=6-8. (E) Niveles extracelulares de la proteína ApoE, cuantificados por ELISA, en medio condicionado sin suero de células de melanoma primario humano SK-Mel-334.2 tratadas con DMSO o GW3965 a 1 µM durante 72 horas. n=4. (F-G) Se sometieron 5 x 10^4 células SK-Mel-334.2, pretratadas con GW3965 a 1 µM durante 72 horas, a los ensayos de invasión celular (F) y reclutamiento endotelial (G) en presencia de anticuerpos 1D7 o IgG a 40 µg/ml. n=7-8. (H) Se determinó la actividad del promotor de *ApoE* fusionado con los elementos potenciadores ME.1 o ME.2 a través de la medición de la actividad del informador luciferasa en células MeWo que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXRα* o *LXRβ* en presencia de DMSO o GW3965 (1 µM) durante 24 horas. n=3-8. (I) Los niveles extracelulares de la proteína ApoE, cuantificados por ELISA, se evaluaron en medio condicionado sin suero recogido de células de melanoma humano MeWo que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXRα* o *LXRβ* en respuesta al tratamiento con GW3965 o T0901317 (1 µM) durante 72 horas. n=3-8. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 50 µm.

Figura 29. La administración terapéutica de agonistas de LXR regula al alza la expresión de *ApoE* derivada de melanoma y sistémica. (A-B) Niveles de expresión de *ApoE*, cuantificados por qRT-PCR, en tumores subcutáneos formados por células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas en ratones C57BL/6. Después de la formación de

tumores de 5 mm^3, los ratones se alimentaron con una dieta control o una dieta que contenía GW3965 (20 mg/kg) (A) o T0901317 (20 mg/kg) (B) durante 7 días. n=3-4. (C-E) Expresión del transcrito de *ApoE* en tumores primarios (C), metástasis pulmonares (D), y metástasis cerebrales (E) formadas por células de melanoma humano MeWo injertadas en ratones NOD Scid a los que se administró pienso control o pienso suplementado con GW3965 (20 mg/kg). Se evaluaron los niveles de *ApoE* en el día 35 (C), día 153 (D), y día 34 (E) después de la inyección de las células cancerosas. n=3-5. (F) Los niveles de expresión relativa de *LXRα*, *LXRβ*, y *ApoE* se determinaron por qRT- PCR en células de melanoma de ratón B16F10 que expresan una horquilla control o un ARNsh dirigido a *LXRα* (sh_ml*XRα*), *LXRβ* de ratón (sh_ml*XRβ*), o *ApoE* de ratón (sh_m*ApoE*). (G-H) Niveles de ARNm de *ApoE* (G) y *ABCA1* (H), medidos por qRT-PCR, en células B16F10 que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXRβ* de ratón o *ApoE* de ratón. Las células se trataron con DMSO o GW3965 a 5 µM durante 48 horas. n=3. (I) Niveles de ARNm de *ABCA1*, medidos por qRT-PCR, en células sanguíneas blancas sistémicas extraídas de ratones *LXRα* -/- o *LXRβ* -/- alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 10 días. n=3-4. (J) Se determinó la expresión relativa del ARNm de *ApoE*, expresada como la frecuencia de etiquetas SAGE, en los tejidos de piel y pulmón de los ratones usando la base de datos pública de Matriz de Expresión de mSAGE disponible en el Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) con fondos del NCI. (K) Expresión relativa del ARNm de *ApoE*, determinada por qRT-PCR, en células de melanoma MeWo disociadas de nódulos metastásicos pulmonares (LM2) o tumores primarios respecto a células parentales MeWo control no seleccionadas. n=3.

Figura 30. El agonismo de LXRβ suprime el crecimiento tumoral y metástasis del melanoma mediante la inducción de la expresión de *ApoE* derivada de melanoma y sistémica. (A) Mediciones por Western blotting de los niveles de la proteína ApoE en lisados de tejido adiposo, pulmonar, y cerebral extraídos de ratones de tipo salvaje alimentados con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (20 mg/kg) o T0901317 (20 mg/kg) durante 10 días. (B) Cuantificación de la expresión de la proteína ApoE sobre la base de las transferencias western mostradas en (A). Se usó tubulina total como un control endógeno para la normalización. n=3-5. (C) Niveles de expresión de *ApoE*, determinados por qRT-PCR, en células sanguíneas blancas sistémicas de ratones alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 o T0901317 a 20 mg/kg durante 10 días. n=3-6. (D) Se inyectaron por vía subcutánea células control B16F10 o células B16F10 que expresan ARNsh dirigidos a *LXRα* de ratón (sh m_*LXRα*) o *LXRβ* de ratón (sh_ml*XRβ*) en ratones C57BL/6-WT, *LXRα* -/- o *LXRβ* -/-. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se alimentaron con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 7 días, después de lo cual se midió el volumen tumoral final. Las imágenes tumorales representativas extraídas en el punto final se muestran en el panel derecho. n=6-18. (E) Niveles del transcrito de *ApoE*, cuantificados por qRT-PCR, en células sanguíneas blancas sistémicas extraídas de ratones *LXRα* -/- o *LXRβ* -/- alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 10 días. n=3-5. (F) Crecimiento tumoral subcutáneo por 5 x 10^4 células control B16F10 o células B16F10 que expresan un ARNsh dirigido a *ApoE* de ratón (sh_m*ApoE*) en ratones C57BL/6-WT o *ApoE*-/-. Después de la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se alimentaron con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 7 días, y se cuantificó el volumen tumoral final. Las imágenes representativas de los tumores extraídos en el día final de la medición (d12) se muestran a la derecha. n=8-18. (G) Colonización pulmonar por 5 x 10^4 células B16F10 transducidas con un ARNsh control o sh_m*ApoE* e inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6-WT o *ApoE*-/-. Empezando a los 10 días antes de la inyección de las células cancerosas, los ratones se asignaron a un tratamiento con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg). Se cuantificaron las metástasis pulmonares en d22 por análisis de imagen bioluminiscente. Los pulmones representativos extraídos en el punto final (d22) se muestran en el panel derecho. n=5-10. (H) Expresión de la proteína ApoE, determinada por análisis de inmunohistoquímica ciegos, en muestras de lesiones cutáneas de melanoma primario no metastásico (n=39) y metastásico (n=34) obtenidas de pacientes en MSKCC. La fracción del área celular teñida positivamente para ApoE se cuantificó como un porcentaje del área tumoral total. (I) Curvas de Kaplan-Meier para la cohorte de MSKCC (n=71) que representan la supervivencia sin metástasis de pacientes como una función de la expresión de la proteína ApoE en las lesiones de melanoma primario de los pacientes. Los melanomas que tenían niveles de ApoE por encima de la mediana de la población se clasificaron como positivos para ApoE (pos), mientras que los tumores con una expresión de ApoE por debajo de la mediana se clasificaron como negativos para ApoE (neg). Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 5 mm (D y F), 100 µm (H).

Figura 31. La activación de LXRβ suprime el crecimiento *in vivo* de líneas de melanoma resistentes a dacarbazina y vemurafenib. (A) Crecimiento celular *in vitro* por 2,5 x 10^4 células parentales B16F10 y células B16F10 resistentes a DTIC derivadas *in vitro* en respuesta a varias dosis de dacarbazina (DTIC) añadida al medio celular durante 4 días. n=3. (B-D) Crecimiento tumoral por 5 x 10^4 células parentales B16F10 sensibles a DTIC (B) o 5 x 10^4 células B16F10 resistentes a DTIC (C) inyectadas por vía subcutánea en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se trataron con dacarbazina (50 mg/kg, i.p., diariamente) o un vehículo control y se asignaron aleatoriamente a pienso regular o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg). Las mediciones del volumen tumoral en el día final se muestran en (D). n=8-16 (B), 7-8 (C). (E-F) Crecimiento tumoral por células parentales MeWo sensibles a DTIC y células de melanoma humano MeWo resistentes a DTIC derivadas *in vitro* en respuesta a tratamientos con DTIC o GW3965. Se inyectaron por vía subcutánea 5 x 10^5 células en ratones NOD Scid gamma. Después de la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se asignaron de forma ciega a un tratamiento control, un tratamiento con DTIC (50 mg/kg, administrado i.p., diariamente en ciclos de 5 días con intervalos sin tratamiento de 2 días), o un tratamiento con una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). Las mediciones de los tumores en el día final se muestran en (F). n=6-8. (G) Crecimiento tumoral por 2 x 10^6 células SK-

Mel-239 de clon resistente a vemurafenib inyectadas por vía subcutánea en ratones NOD Scid gamma que se asignaron a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) posteriormente al crecimiento de los tumores hasta un volumen de 5-10 mm^3. n=7-8. (H) Supervivencia global de los ratones después del injerto de 2 x 10^6 células SK-Mel-239 resistentes a vemurafenib. Después del crecimiento de los tumores hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se alimentaron continuamente con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). n=7. (I) Modelo derivado experimentalmente que representa la activación de ApoE sistémica y autónoma de melanoma por la terapia de activación de LXRβ en la mediación de la supresión de los fenotipos de progresión de melanoma. La ApoE extracelular suprime las metástasis de melanoma mediante la inhibición coordinada de la invasión celular del melanoma y el reclutamiento endotelial no autónomo de células a través de la toma como diana de los receptores LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales, respectivamente. Todos los datos se representan como media ± SEM. Barra de escala, 5 mm.

Figura 32. Supresión inducida por dacarbazina del crecimiento tumoral por células de melanoma humano. (A) Crecimiento tumoral por 5 x 10^5 células parentales MeWo sensibles a DTIC inyectadas por vía subcutánea en ratones Nod SCID gamma. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se trataron con un vehículo control o DTIC (50 mg/kg, administrado i.p., diariamente en ciclos de 5 días con intervalos sin tratamiento de 2 días), y se midió el volumen tumoral dos veces a la semana. n=6.

Figura 33. Supresión mediada por ApoE de la invasión celular en múltiples tipos de cáncer. Se ensayaron (A-B) 5 x 10^4 células de melanoma uveal humano MUM2B y OCM1, (C-E) 5 x 10^4 células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-231, MDA-468, y BT 549, (F-G) 5 x 10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1 y BXPC-3, y (H-I) 5 x 10^4 células de cáncer renal humano 786-00 y RCC4 para determinar su capacidad de invasión a través de insertos trans-well recubiertos con matrigel *in vitro*. Se añadieron BSA o ApoE recombinante al medio celular a 100 µg/ml al inicio del ensayo. n=4. Todos los datos se representan como media ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 34. Efectos de los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO- 2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en la expresión de ApoE en células de melanoma humano. (A-D) Se trataron células MeWo de melanoma humano con DMSO o los agonistas de LXR LXR-623 (A), WO-2007-002563 (B), WO-2010-0138598 (C), o SB742881 (D) a 500 nM, 1 µM, o 2 µM durante 48 horas. Los niveles de expresión de ApoE se cuantificaron posteriormente por qRT-PCR. n=3. Todos los datos se representan como media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 35. El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 inhibe la invasión *in vitro* de células tumorales de cáncer renal, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón. (A-C) Invasión de matrigel trans-well por 5 x 10^4 células de cáncer renal humano RCC (A), 5 x 10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1 (B), y 5 x 10^4 células de cáncer de pulmón humano H460 (C) que se trataron con DMSO o GW3965 a 1 µM durante 72 horas antes del ensayo. n=4. Todos los datos se representan como media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 36. El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 inhibe el crecimiento tumoral del cáncer de mama *in vivo*. Crecimiento tumoral primario por 2 x 10^6 células de cáncer de mama humano MDA-468 inyectadas en los panículos adiposos mamarios de ratones NOD Scid gamma. Dos días antes de la inyección de las células cancerosas, los ratones se asignaron a un tratamiento con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (75 mg/kg) y se mantuvieron en la dieta correspondiente a lo largo del experimento. n=8. Todos los datos se representan como media ± SEM. ***p<0,001.

Figura 37. Efectos de los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en los fenotipos de progresión de melanoma *in vitro*. (A) Invasión celular por 1 x 10^5 células de melanoma humano MeWo pretratadas con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 a 1 µM cada uno durante 72 horas. Se cuantificó el número de células que invadieron el lado basal de los insertos trans-well recubiertos con matrigel. n=5. (B) Reclutamiento endotelial por 5 x 10^4 células MeWo pretratadas con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej.9, o SB742881 a 1 µM cada uno durante 72 horas. Las células cancerosas se sembraron en la parte inferior de una placa de 24 pocillos. Las células endoteliales se sembraron en un inserto trans-well ajustado en cada pocillo y se dejó que migraran hacia las células cancerosas. Se cuantificó el número de células endoteliales que migraban hacia el lado basal de cada inserto trans-well. n=4-5. Todos los datos se representan como media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 38. Efectos de los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO- 2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en el crecimiento tumoral *in vivo*. (A-D) Crecimiento tumoral por 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas por vía subcutánea en ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaran un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se asignaron aleatoriamente a un tratamiento con una dieta control, un tratamiento con una dieta suplementada con LXR-623 a 20 mg/kg/día (A) un tratamiento con una dieta suplementada con WO-2007-002563 Ej. 19 a 100 mg/kg/día (B), un tratamiento con una dieta suplementada con WO-2010-0138598 Ej. 19 a 10 mg/kg/día o 100 mg/kg/día (C), o un tratamiento con una dieta suplementada con SB742881 a 100 mg/kg/día (D). n=8-10. Todos los datos se representan como media ± SEM.

Descripción detallada de la invención

La presente invención presenta métodos para prevenir o reducir la proliferación, diferenciación, o supervivencia aberrante de células. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser útiles para reducir el riesgo de, o prevenir, el incremento del tamaño de tumores o que alcancen un estado metastásico. Los compuestos objeto pueden administrarse para parar la progresión o avance del cáncer. Además, la presente invención incluye el uso de los compuestos objeto para reducir el riesgo de, o prevenir, una recurrencia del cáncer.

La progresión metastásica requiere que conjuntos de proteínas efectoras implicadas en los fenotipos celulares comunes se expresen de forma coherente (Gupta y Massagué, 2006 Cell *127*, 679-695; Hanahan y Weinberg, 2011 Cell *144*, 646-674; Talmadge y Fidler, 2010 Cancer Res. *70*, 5649-5669; Hynes, 2003 Cell *113*, 821-823). Dichos estados de expresión concertada son aparentes en perfiles de expresión génica de cánceres de mama primarios que metastatizan (Wang *et al.*, 2005 Lancet *365*, 671-679), así como en perfiles de clones de células cancerosas humanas que presentan una actividad metastásica aumentada (Kang *et al.*, 2003 Cancer Cell *3*, 537-549; Minn *et al.*, 2005 Nature *436*, 518-524). En los últimos años, la regulación posterior a la transcripción ha emergido como un modo generalizado y robusto de un estado de expresión concertada y control del nivel fenotípico. La clase más estudiada de reguladores posteriores a la transcripción con actividad reguladora metastásica son ARN no codificadores pequeños (miARN) (Bartel, 2009 Cell *136*, 215-233; Fabian et al, 2010 Annu. Inv. Biochem, *79*, 351-379; Filipowicz et al, 2008 Nat. Inv. Genet. *9*, 102-114). Los miARN promotores de la metástasis (Ma et al, 2007 Nature *449*, 682-688; Huang et al, 2008 Nat. Cell Biol. *10*, 202-210) y los miARN supresores de la metástasis (Tavazoie et al, 2008 Nature *451*, 147-152) se descubrieron originariamente en el cáncer de mama. Los estudios posteriores revelaron muchos más miARN con papeles reguladores en la tumorogénesis y metástasis de otros tipos de cáncer (Hatziapostolou et al, 2011 Cell *147*, 1233-1247; Hurst et al, 2009 Cancer Res. *69*, 7495-7498; Olson et al, 2009 Genes Dev. *23*, 2152-2165; Zhang et al, 2010 Oncogene *29*, 937-948). En muchos casos, los niveles de expresión de estos miARN en las muestras de cáncer humano han apoyado sus papeles experimentales en la metástasis. Así, la expresión desregulada de miARN (Garzon et al, 2010 Nat. Rev. Drug Discov. *9*, 775-789; Lujambio y Lowe, 2012 Nature *482*, 347-355) y, más recientemente, la expresión desregulada de ARN no codificadores largos (Calin et al, 2007 Nat. Rev. Cancer *6*, 857-866; Gupta et al, 2010 Nature *464*, 1071-1076; Guttman et al, 2009 Nature *458*, 223-227; Huarte et al, 2010 Cell *142*, 409-419; Loewer et al, 2010 Nat. Genet. *42*, 1113-1117), así como pseudogenes no codificadores que compiten con la unión de miARN endógenos (Poliseno et al, 2010 Nature *465*, 1033-1038) parece que son características generalizadas del cáncer humano. Las claves respecto al control robusto ejercido por miARN específicos en la progresión metastásica provienen de un trabajo temprano que muestra que la toma como diana concertada de múltiples genes de metástasis por un único miARN supresor de metástasis era responsable de los efectos dramáticos en la supresión de la metástasis (Tavazoie et al, 2008 Nature *451*, 147-152). Dicha toma de diana de genes divergente por miARN ha surgido como una característica definitoria de estos reguladores.

A un nivel conceptual, la necesidad de una regulación divergente de la expresión génica en el cáncer se entiende fácilmente. Un miARN podría ejercer una supresión metastásica robusta gracias a su capacidad de tomar como diana múltiples genes requeridos para la metástasis. El silenciamiento por los miARN a través de mecanismos genéticos o epigenéticos promovería fácilmente la progresión del cáncer mediante la desrrepresión de múltiples promotores de la metástasis (Png *et al.*, 2011 Nature *481*, 190-194). Es más sutil un papel para la regulación convergente de un único gen por múltiples miARN reguladores de la metástasis. Este escenario emergería si existiera un gen clave que actuara como un supresor robusto de la progresión metastásica. La toma como diana convergente y cooperativa de este gen por múltiples miARN podría conseguir un silenciamiento máximo de dicho gen clave supresor de la metástasis. Este escenario, a diferencia de la deleción genética, puede observarse en casos en los que una pérdida completa de un gen diana no podría ser tolerada por la célula, y el gen se requiriera a niveles bajos para mediar acciones metabólicas, por ejemplo. Dada esta posibilidad, una búsqueda de miARN promotores de la metástasis cooperativos puede descubrir nuevos genes que son cruciales para la supresión de la metástasis y puede proporcionar información terapéutica para dar lugar a tratamientos más efectivos para la prevención de la metástasis.

Como se describe en la presente memoria, a través de una estrategia sistemática basada en la selección *in vivo*, se identificó que un conjunto de miARN estaba desrregulado en múltiples líneas metastásicas independientes derivadas de múltiples pacientes con melanoma - un cáncer altamente prevalente con una incidencia creciente (Garbe y Leiter, 2009 Clin. Dermatol. *27*, 3-9). Como se describe en la presente memoria, miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p actúan como promotores endógenos robustos de la metástasis del melanoma a través de la toma como diana convergente del gen metabólico de ApoE y la proteína de choque por calor DNAJA4. A través de análisis de pérdida de función, ganancia de función, y epistáticos, se delinea una red de miARN cooperativos que silencia de forma máxima la señalización de ApoE. La ApoE secretada por las células cancerosas inhibe la invasión metastásica y el reclutamiento endotelial, que está mediado a través de sus acciones en distintos receptores en células de melanoma y endoteliales. Estos miARN presentan una capacidad de pronóstico significativa para identificar pacientes que desarrollan una recidiva metastásica de melanoma, mientras la administración terapéutica de LNA dirigidos a estos miARN inhibe significativamente las metástasis de melanoma. La falta actual de terapias efectivas para la prevención de metástasis de melanoma después de la resección quirúrgica (Garbe *et al.*, 2011 Oncologist *16*, 5-24) requiere una comprensión molecular y mecanísitica mejorada acerca de la progresión metastásica del melanoma. Para este fin, los descubrimientos descritos en la presente memoria revelan varios genes nuevos no codificadores y codificadores clave implicados en la progresión del melanoma y ofrecen una nueva posibilidad tanto para identificar a pacientes con alto riesgo de metástasis de melanoma como para tratarlos.

A continuación, se listan secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de los miembros de la red mencionada anteriormente y varias otras secuencias.

APOE - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 1)

gggatccttgagtcctactcagccccagcggaggtgaaggacgtccttccccaggagccgactggccaatcacaggcaggaag
atgaaggttctgtgggctgcgttgctggtcacattcctggcaggatgccaggccaaggtggagcaagcggtggagacagagcc
ggagcccgagctgcgccagcagaccgagtggcagagcggccagcgctgggaactggcactgggtcgcttttgggattacctg
cgctgggtgcagacactgtctgagcaggtgcaggaggagctgctcagctcccaggtcacccaggaactgagggcgctgatgg
acgagaccatgaaggagttgaaggcctacaaatcggaactggaggaacaactgaccccggtggcggaggagacgcgggcac
ggctgtccaaggagctgcaggcggcgcaggcccggctgggcgcggacatggaggacgtgtgcggccgcctggtgcagtacc
gcggcgaggtgcaggccatgctcggccagagcaccgaggagctgcgggtgcgcctcgcctcccacctgcgcaagctgcgtaa
gcggctcctccgcgatgccgatgacctgcagaagcgcctggcagtgtaccaggccggggcccgcgagggcgccgagcgcg
gcctcagcgccatccgcgagcgcctggggccccctggtggaacagggccgcgtgcgggccgccactgtgggctccctggccg
gccagccgctacaggagcgggcccaggcctggggcgagcggctgcgcgcgcggatggaggagatgggcagccggacccg
cgaccgcctggacgaggtgaaggagcaggtggcggaggtgcgcgccaagctggaggagcaggcccagcagatacgcctgc
aggccgaggccttccaggcccgcctcaagagctggttcgagcccctggtggaagacatgcagcgccagtgggccgggctggt
ggagaaggtgcaggctgccgtgggcaccagcgccgcccctgtgcccagcgacaatcactgaacgccgaagcctgcagccatg
cgaccccacgccacccccgtgcctcctgcctccgcgcagcctgcagcgggagaccctgtcccgccccagccgtcctcctgggg
tggaccctagtttaataaagattcaccaagtttcacgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

APOE - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2)

mkvlwaallv tflagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelalgr fwdylrwvqt lseqvqeell
ssqvtqelra lmdetmkelk aykseleeql tpvaeetrar lskelqaaqa rlgadmedvc grlvqyrgev
qamlgqstee lrvrlashlr klrkrllrda ddlqkrlavy qagaregaer glsairerlg plveqgrvra atvgslagqp
lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrldev keqvaevrak leeqaqqirl qaeafqarlk swfeplvedm
qrqwaglvek vqaavgtsaa pvpsdnh

(Los residuos 136-150 subrayados representan el dominio de unión a LRP de Apo E)

DNAJA4 isoforma 1 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 3)

agucccacccuucggcgcagggcuccggccaacacagcccuccaggccgccuacucuccagccagccggcuccacggа
cccacggaagggcaaggggcggccucggggcggcgggacaguugucggagggcgcccuccaggcccaagccgccu
ucuccggcccccgccauggcccggggcggcagucagagcuggagcuccggggaaucagacgggcagccaaaggagca
gacgcccgagaagcccagacacaagauggugaaggagacccaguacuaugacaucccugggcgugaagcccagcgcgu
ccccggaggagaucaagaaggccuaucggaagcuggcgcucaaguaccacccggacaagaacccggaugagggcgag
aaguuuaaacucauaucccaggcauaugaagugcuuucagauccaaagaaaagggauguuuaugaccaaggcggaga
gcaggcaauuaaagaaggaggcucaggcagccccagcuucucuucacccauggacaucuuugacauguucuuuggug
gugguggacggauggcuagagagagaagaggcaagaauguuguacaccaguuaucuguaacucuugaagaucuaua
uaauggagucacgaagaaauuggcccuccagaaaaauguaauuugugagaaaugugaagguguuggugggaagaag
ggaucgguggagaagugcccgcugugcaaggggcgggggaugcagauccacauccagcagaucgggccgggcaugg
uacagcagauccagaccgugugcaucgagugcaagggccagggugagcgcaucaaccccaaggaccgcugcgagagc

ugcagcggggccaaggugauccgugagaagaagauuaucgagguacauguugaaaaagguaugaaagaugggcaaa
agauacuauuucauggagaaggagaucaggagccugagcuggagccuggugaugucauaauugugcuugaucagaa
ggaucauagugucuuucagagacgaggccaugacuugaucaugaaaaugaaaauucagcuuucugaagcucuuugu
ggcuucaagaagacgauaaaaacauuggacaaucgaauucuuguuauuacauccaaagcaggugaggugauaaagca
cggggaccugagaugcgugcgcgaugaaggaaugcccaucuacaaagcaccccuggaaaaagggauucugaucauac
aguuuuuaguaaucuuuccugaaaaacacuggcuuucucuggaaaagcuuccucagcuggaagcuuuacucccuccu
cgacagaaagugaggauuacagaugacauggaucagguggagcugaaggaguuuugucccaaugagcagaacuggc
gucagcacagggaggccuacgaggaggacgaagacgggccccaggcuggagugcagugccagacggcaugacgugg
ugcggggcagcguggccccaccggacuagcacaugaugaauguaaaguuggcacaaugaaaaugacaucgcuuuaau
ggccuuguguuuggggauguccuguguauguguucagcauucuuaauugcugagugucuuuuuggcuuuucuuuu
gguuguaacuuaaguuauagcuuaauuuauauuuaaaauguuuuaaguauaaaucaccucuagucugcauauggaau
cuguucauuucuauuuucaggauauacuuuugagaugucagugauugcaccaauacuuugugcuucuaguggcuu
ugccauaauucaugugucaccaauaaggcacagcccaguuagcagcuuagccccccuagcaaaccccaaggcacaaagu
gggcauccugacucaucucuaggucuguggguuucucccccucuucccuuggcagaguuauugagggcaugaucucag
ggcugcuaagauaacauuucugaggauucuagaugauccucuuaaagaauaaaagcacauccguggaucggacaugg
cugcaugugccugcuuaacagggccaacuuaguuccuacuguucugugcccuucaguggauggaacgugagugucu
gaucaucucucuuggaaguuuucugaaccuuccaagcucuguggugaggacaaaccaguguuugaaucauaugcug
auaacuguuugccugugacccucacaccuuguucuucaggguuuuaaugauuuucuguugacaacuuuugcaaugc
uuucccaccaaagugcuuacuuguaaagaaaacuaaauccuucugugucccggcagccucagugcagcaacagaagc
caagggagaaugcugcugguuuggcccauggcacagccagcuucucugaccaguaaucccggggugacuugaggguc
ugcaaaggcauagaacucccccaguguuuuccaccucauucucccagauugagcucccuuccaaaggaucguuccucu
cauugcacagccauauuacaaaggguuuccugcucaagugauguuuuugguaagaacuucgcugaguuccacugugg
auuacaguuuguauggacuacuacuguaaauuauagcuuguuuggagggauauuagucauuauuuuauucaugaca
gguagacuacaauucgaacuuaggguuaccucagucuuuagccauuacugcuuauuucuuuucccccaagucacaaaa
aacuuguaagcugcuggguuaaagcagaggccaccugucagaucuacccuacccuuauuugguuacauggcaccuga
gaguuucacucagaccagggaucuuccuuaggagggucaaagugcagaucagaccaugcagguaaggugaaccagcu
gcacggaccaggguucccgcaaaacauugccagcuagugaggcauaaauuugcucaaaguauagaaacagcccaccugu
gcccacuuugaccauuggugaggauagauauaaaaucacuucuuccaacgaagccuaggugaaaaucuauuuauaaa
uggaccacaacucuggggugucguuuuugugcugugacuuccuaauuauugcuaaagaacuacuguuuaguuggua
augguguaaaauuacauucagcuccuucuugucauauaaaaggaauuuggagggugucgcuuaaaaauuuuauucca
ccuguacauuugucacuuuaaaauuaaaauugagcugguaugagagauaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

DNAJA4 isoforma 1 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4)

marggsqsws sgesdgqpke qtpekprhkm vketqyydil gvkpsaspee ikkayrklal kyhpdknpde
gekfklisqa yevlsdpkkr dvydqggeqa ikeggsgsps fsspmdifdm ffggggrmar errgknvvhq
lsvtledlyn gvtkklalqk nvicekcegv ggkkgsvekc plckgrgmqi hiqqigpgmv qqiqtvciec
kgqgerinpk drcescsgak virekkiiev hvekgmkdgq kilfhgegdq epelepgdvi ivldqkdhsv
fqrrghdlim kmkiqlseal cgfkktiktl dnrilvitsk agevikhgdl rcvrdegmpi ykaplekgil iiqflvifpe
khwlsleklp qleallpprq kvritddmdq velkefcpne qnwrqhreay eededgpqag
vqcqta

DNAJA4 isoforma 2 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 5)

gugaccgugacgcgcgagcgggcggcgggggcgcgggccaggggcgcgggccagggugccggcaggggcguccgg
ggcgcucugaccggccucgcccgccccccccgcagacacaagauggugaaggagacccaguacuaugacauccugggc
gugaagcccagcgcgucccggaggagaucaagaaggccuaucggaagcuggcgcucaaguaccacccggacaagaac
ccggaugagggcgagaaguuuaaacucauaucccaggcauaugaagugcuuucagauccaaagaaaagggauguuua

ugaccaaggcggagagcaggcaauuaaagaaggaggcucaggcagccccagcuucucuucacccauggacaucuuug
acauguucuuuggugguggguggacggauggcuagagagagaagaggcaagaauguuguacaccaguuaucuguaac
ucuugaagaucuauauaauggagucacgaagaaauuggcccuccagaaaaauguaauuugugagaaaugugaaggu
guuggugggaagaagggaucgguggagaagugcccgcugugcaaggggcgggggaugcagauccacauccagcaga
ucgggccgggcaugguacagcagauccagaccgugugcaucgagugcaagggccagggugagcgcaucaaccccaag
gaccgcugcgagagcugcagcggggccaaggugauccgugagaagaagauuaucgagguacauguugaaaaaggua
ugaaagaugggcaaaagauacuauuucauggagaaggagaucaggagccugagcuggagccuggugaugucauaau
ugugcuugaucagaaggaucauaugugucuuucagagacgaggccaugacuugaucaugaaaaugaaaauucagcuu
ucugaagcucuuuguggcuucaagaagacgauaaaaacauuggacaaucgaauucuuguuauuacauccaaagcagg
ugaggugauaaagcacggggaccugagaugcgugcgcgaugaaggaaugcccaucuacaaagcaccccuggaaaaag
ggauucugaucauacaguuuuuaguaaucuuuccugaaaaacacuggcuuucucuggaaaagcuuccucagcugga
agcuuuacucccuccucgacagaaagugaggauuacagaugacauggaucagguggagcugaaggaguuuuguccc
aaugagcagaacuggcgucagcacagggaggccuacgaggaggacgaagacgggccccaggcuggagugcagugcca
gacggcaugacgugguggcggggcagcguggccccaccggacuagcacaugaugaauguaaaguuggcacaaugaaaa
ugacaucgcuuuaauggccuuguguuuugggauguccuguguauguguucagcauucuuaauugcugagugucuuu
uuggcuuuucuuuuggguuguaacuuaaguuauagcuuaauuuauauuuaaaauguuuuaaguauaaaucaccucuag
ucugcauauggaaucuguucauuucuauuuucaggauauacuuuugagaugucagugauugcaccaauacuuugug
cuucuaguggcuuugccauaauucagugucaccaauaaggcacagcccaguuagcagcuuagccccccuagcaaaccc
caaggcacaaaguggggcauccugacucaucucuaggucuguggguuucucccccucuucccuuggcagaguuauugag
ggcaugaucucagggcugcuaagauaacauuucugaggauucuagaugauccucuuaaagaauaaaagcacauccgu
ggaucggacauggcugcaugugccugcuuaacagggccaacuuaguuccuacuguucugugcccuucaguggaugg
aacgugagugucugaucaucucucuuggaaguuuucugaaccuuccaagcucuguggugaggacaaaccaguguuu
gaaucauaugcugauaacuguuugccugugacccucacaccuuguucuucaggguuuuaaugauuuucuguugaca
acuuuugcaaugcuuucccaccaaagugcuuacuuguaaagaaaacuaaaauccuucugugucccggcagccucagu
gcagcaacagaagccaagggagaaugcugcuggguuuggcccauggcacagccagcuucucugaccaguaaucccggg
ugacuugagggucugcaaaggcauagaacuccccaguguuuuccaccucauucucccagauugagcucccuuccaaa
ggaucguucccucucauugcacagccauauuacaaaggguuuccugcucaagugauguuuuggguaagaacuucgcug
aguuccacuguggauuacaguuuguauggacuacuacuguaaauuauagcuuguuuggagggauauuagucauuau
uuuauucaugacagguagacuacaauucgaacuuaggguuaccucagucuuuagccauuacugcuuauuucuuuuc
cccaagucacaaaaaacuuguaagcugcuggguuaaagcagaggccaccugucagaucuacccuacccuuauuuggu
uacauggcaccugagaguuucacucagaccagggaucuuccuuaggagggucaaagugcagaucagaccaugcaggu
aaggugaaccagcugcacggaccaggguucccgcaaaacauugccagcuagugaggcauaauuugcucaaaguauaga
aacagcccaccugugcccacuuugaccauuggugaggauagauauaaaaucacuucuuccaacgaagccuaggugaa
aaucuauuuauaaaauggaccacaacucuggggugucguuuuugugcugugacuuccuaauuauugcuaaagaacua
cuguuuaguugguaaugguguaaaauuacauucagcuccuucuugucauauaaaaggaauuuggagggugucgcuu
aaaauuuuauuccaccuguacauuugucacuuuaaaauuaaaauugagcugguaugagagauaaaaaaaaaaaaaaaa
aaa

DNAJA4 isoforma 2 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6)

mvketqyydi lgvkpsaspe eikkayrkla lkyhpdknpd egekfklisq ayevlsdpkk rdvydqggeq
aikeggsgsp sfsspmdifd mffggggrma rerrgknvvh qlsvtledly ngvtkklalq knvicekceg

vggkkgsvek cplckgrgmq ihiqqigpgm vqqiqtvcie ckgqgerinp kdrcescsga kvirekkiie vhvekgmkdg qkilfhgegd qepelepgdv iivldqkdhs vfqrrghdli mkmkiqlsea lcgfkktikt ldnrilvits kagevikhgd lrcvrdegmp iykaplekgi liiqflvifp ekhwlslekl pqleallppr qkvritddmd qvelkefcpn eqnwrqhrea yeededgpqa gvqcqta

DNAJA4 isoforma 3 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 7)

acauuucagcaagcuggcuaaagacaugugggaaagccugacccuggauucaggucaaaucucagcacucacaagau
uuaaacucauaucccaggcauaugaagugcuuucagauccaaagaaaagggauguuuaugaccaaggcggagagcag
gcaauuaaagaaggaggcucaggcagccccagcuucucuucacccauggacaucuuugacauguucuuugguggug
guggacggauggcuagagagagaagaggcaagaauguuguacaccaguuaucuguaacucuugaagaucuauauaa
uggagucacgaagaaauuggcccuccagaaaaauguaauuugugagaaaugugaagguguuggugggaagaaggga
ucgguggagaagugcccgcugugcaaggggcgggggaugcagauccacauccagcagaucgggccgggcaugguac
agcagauccagaccgugugcaucgagugcaagggccagggugagcgcaucaaccccaaggaccgcugcgagagcugc
agcggggccaaggugauccgugagaagaagauuaucgagguacauguugaaaaagguaugaaagaugggcaaaaga
uacuauuucauggagaaggagaucaggagccugagcuggagccuggugaugucauaauugugcuugaucagaagga
ucauagugucuuucagagacgaggccaugacuugaucaugaaaaugaaaauucagcuuucugaagcucuuuguggc
uucaagaagacgauaaaaacauuggacaaucgaauucuuguuauuacauccaaagcaggugaggugauaaagcacgg
ggaccugagaugcgugcgcgaugaaggaaugcccaucuacaaagcaccccuggaaaaagggauucugaucauacagu
uuuuaguaaucuuuccugaaaaacacuggcuuucucuggaaaagcuuccucagcuggaagcuuuacucccuccucga
cagaaagugaggauuacagaugacauggaucagguggagcugaaggaguuuugucccaaugagcagaacuggcguc
agcacagggaggccuacgaggaggacgaagacgggccccaggcuggagugcagugccagacggcaugacguggugc
ggggcagcguggccccaccggacuagcacaugaugaauguaaaguuggcacaaugaaaaugacaucgcuuuaauggc
cuuguguuugggauguccuguguauguguucagcauucuuaauugcugagugucuuuuuggcuuuucuuuuggu
uguaacuuaaguuauagcuuaauuuauauuuaaauguuuuaaguauaaaucaccucuagucugcauauggaaucug
uucauuucuauuuucaggauauacuuuugagaugucagugauugcaccaauacuuugugcuucuaguggcuuugcc
auaauucagugucaccaauaaggcacagcccaguuagcagcuuagccccccuagcaaaccccaaggcacaaaagugggc
auccugacucaucucuaggucugugguuucucccccucuucccuuggcagaguuauugagggcaugaucucagggcu
gcuaagauaacauuucugaggauucuagaugauccucuuaaagaauaaaagcacauccguggaucggacauggcugc
augugccugcuuaacagggccaacuuaguuccuacuguucugugcccuucaguggauggaacgugagugucugauc
aucucucuuggaaguuuucugaaccuuccaagcucuguggugaggacaaaccaguguuugaaucauaugcugauaa
cuguuugccugugacccucacaccuuguucuucagggauuuuaaugauuuucuguugacaacuuuugcaaugcuuuc
ccaccaaagugcuuacuuguaaagaaaacuaaauccuucugugucccccggcagccucagugcagcaacagaagccaag
ggagaaugcugcugguuuggcccauggcacagccagcuucucugaccaguaauccgggggugacuugagggucugca
aaggcauagaacucccccaguguuuuccaccucauucucccagauugagcucccuuccaaaggaucguuccucucauu
gcacagccauauuacaaaggguuuccugcucaagugauguuuuggguaagaacuucgcugaguuccacuguggauua
caguuuguauggacuacuacuguaaauuauagcuuguuuggagggauauuagucauuauuuuauucaugacaggua
gacuacaauucgaacuuaggguuaccucagucuuuagccauuacugcuuauuucuuuuccccaagucacaaaaaacu
uguaagcugcuggguuaaagcagaggccaccugucagaucuacccuacccuuauuugguuacauggcaccugagag
uuucacucagaccagggaucuuccuuaggagggucaaagugcagaucagaccaugcagguaaggugaaccagcugca
cggaccaggguucccgcaaaacauugccagcuagugaggcauaaauuugcucaaaguauagaaacagcccaccugugccc
acuuugaccauuggugaggauagauauaaaaucacuucuuccaacgaagccuaggugaaaaucuauuuauaaaaugga
ccacaacucuggggugucguuuuugugcugugacuuccuaauuauugcuaaagaacuacuguuuaguugguaaugg
uguaaaauuacauucagcuccuucuugucauauaaaaggaauuuggagggugucgcuuaaaauuuuauuccaccug
uacauuugucacuuuaaaauuaaaauugagcugguaugagagauaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

DNAJA4 isoforma 3 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8)

mwesltldsg qisaltrfkl isqayevlsd pkkrdvydqg geqaikeggs gspsfsspmd ifdmffgggg
rmarerrgkn vvhqlsvtle dlyngvtkkl alqknvicek cegvggkkgs vekcplckgr gmqihiqqig
pgmvqqiqtv cieckgqger inpkdrcesc sgakvirekk iievhvekgm kdgqkilfhg egdqepelep
gdviivldqk dhsvfqrrgh dlimkmkiql sealcgfkkt iktldnrilv itskagevik hgdlrcvrde gmpiykaple
kgiliiqflv ifpekhwlsl eklpqleall pprqkvritd dmdqvelkef cpneqnwrqh reayeededg
pqagvqcqta

LRP1 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 9)

cagcggugcgagcuccaggcccaugcacugaggaggcggaaacaaggggagccccagagcuccaucaagcccccucc
aaaggcucccuacccgguccacgccccccacccccccuccccgccuccucccaauugugcauuuuugcagccggagg
cggcuccgagauggggcugugagcuucgcccggggaggggaaagagcagcgaggagugaagcgggggggugggg
ugaaggguuuggauuucggggcaggggggcgcacccccgucagcaggcccucccccaaggggcucggaacucuaccuc
uucacccacgccccuggugcgcuuugccgaaggaaagaauaagaacagagaaggaggaggggaaaggaggaaaagg
gggacccccccaacuggggggggugaaggagagaaguagcaggaccagaggggaaggggcugcugcuugcaucagcc
cacaccaugcugaccccgccguugcuccugcugcugccccugcucucagcucuggucgcggcggcuaucgacgcccc
uaagacuugcagccccaagcaguuugccugcagagaucaaauaaccuguaucucaaagggcuggcggugcgacggug
agagggacugcccagacggaucugacgaggccccugagauuuguccacagaguaaggcccagcgaugccagccaaac
gagcauaacugccuggguacugagcugugugguucccaugucccgccucugcaauggggguccaggacugcauggacg
gcucagaugaggggccccacugccgagagcuccaaggcaacugcucucgccugggcugccagcaccauugugucccc
acacucgaugggcccaccugcuacugcaacagcagcuuucagcuucaggcagauggcaagaccugcaaagauuuuga
ugagugcucaguguacggcaccugcagccagcuaugcaccaacacagacggcuccuucauauguggcuguguugaag
gauaccuccugcagccggauaaccgcuccugcaaggccaagaacgagccaguagaccggccccugugcuguugaua
gccaacucccagaacaucuuggccacguaccugaguggggcccaggugcuaccaucacaccuacgagcacgcggcag
accacagccauggacuucagcuaugccaacgagaccguaugcugggugcauguuggggacagugcugcucagacgca
gcucaagugugcccgcaugccuggccuaaagggcuucguggaugagcacaccaucaacaucucccucagucugcacc
acguggaacagauggccaucgacuggcugacaggcaacuucuacuuuguggaugacaucgaugauaggaucuuugu
cugcaacagaaaauggggacacaugugucacauugcuagaccuggaacucuacaaccccaagggcauugcccuggaccc
ugccaugggaaggugcuuuuucacugacuaugggcagaucccaaagguggaacgcugugacauggaugggcagaac
cgcaccaagcucgucgacagcaagauuguguuuccucauggcaucacgcuggaccuggucagccgccuugcuacug
ggcagaugccuaucuggacuauauugaagugguggacuaugagggcaagggccgccagaccaucauccagggcaucc
ugauugagcaccuguacggccugacuguguuugagaauuaucucuaugccaccaacucggacaaugccaaugcccag
cagaagacgagugugaucccgugugaacccgcuuuaacagcaccgaguaccagguugucacccgggguggacaagggug
gugcccuccacaucuaccaccagaggcgucagccccgagugaggagccaugccugugaaaacgaccaguaugggaag
ccgggguggcugcucugacaucugccugcuggccaacagccacaaggcgcggaccugccgcugccguuccggcuucag
ccugggcagugacgggaagucaugcaagaagccggagcaugagcuguuccucguguauggcaagggccggccaggc
aucauccggggcauggauauggggggccaaggucccggaugagcacaugaucccccauugaaaaccucaugaaccccccg
agcccuggacuuccacgcugagaccggcuucaucuacuuugccgacaccaccagcuaccucauuggccgccagaagau
ugauggcacugagcgggagaccauccugaaggacggcauccacaauguggagggugugggccguggacuggauggga
gacaaucuguacuggacggacgaugggcccaaaaagacaaucagcguggccaggcuggagaaagcugcucagacccg
caagacuuuaaucgagggcaaaaugacacaccccagggcuauuguggguggauccacucaaugggugggauguacugga
cagacugggaggaggaccccaaggacagucggcgugggcggcuggagagggcguggauggauggcucacaccgaga
caucuuugucaccuccaagacagugcuuuggcccaaugggcuaagccuggacaucccggcugggcgccucuacuggg
uggaugccuucuacgaccgcaucgagacgauacugcucaauggcacagaccggaagauuguguaugaagguccugag
cugaaccacgccuuuggccugugucaccauggcaacuaccucuucuggacugaguaucggaguggcagugucuacc
gcuuggaacgggguguaggaggcgcacccccacugugacccuucugcgcagugagcggccccccaucuuugagauc
cgaauguaugaugcccagcagcagcaaguuggcaccaacaaaugccgggugaacaauggcggcugcagcagccugug
cuuggccaccccugggagccgccagugcgccugugcugaggaccagguguuggacgcagacggcgucacuugcuug

gcgaacccauccuacgugccuccaccccagugccagccaggcgaguuugccugugccaacagccgcugcauccaggag
cgcuggaagugugacggagacaacgauugccuggacaacagugaugaggccccagcccucugccaucagcacaccug
ccccucggaccgauucaagugcgagaacaaccggugcaucccccaaccgcuggcucugcgacggggacaaugacugug
ggaacagugaagaugaguccaaugccacuuguucagcccgcaccugccccccccaaccaguucuccugugccaguggc
cgcugcaucccccaucuccuggacgugugaucuggaugacgacugugggggaccgcucugaugagucugcuucgugug
ccuaucccaccugcuucccccugacucaguuuaccugcaacaauggcagauguaucaacaucaacuggagaugcgaca
augacaaugacuguggggacaacagugacgaagccggcugcagccacuccuguucuagcacccaguucaagugcaac
agcgggcguugcaucccccgagcacuggaccugcgaugggggacaaugacugcggagacuacagugaugagacacacgc
caacugcaccaaccaggccacgaggcccccuggugggcugccacacugaugaguuccagugccggcuggauggacuau
gcaucccccugcgguggcgcugcgaugggggacacugacugcauggacuccagcgaugagaagagcugugagggagu
gacccacgucugcgaucccaguucaaguuuggcugcaaggacucagcucggugcaucagcaaagcgugggugugu
gauggcgacaaugacugugaggauaacucggacgaggagaacugcgaguccccuggccugcaggccacccucgcaccc
uugugccaacaacaccucagucugccugccccccugacaagcugugugauggcaacgacgacuguggcgacggcucag
augagggcgagcucugcgaccagugcucucugaauaacgguggcugcagccacaacugcucaguggcaccuggcgaa
ggcauuguguguuccugcccucugggcauggagcuggggcccgacaaccacaccugccagauccagagcuacugugc
caagcaucucaaaugcagccaaaagugcgaccagaacaaguucagcgugaagugcuccugcuacgagggcugggucc
uggaaccugacggcgagagcugccgcagccuggaccccuucaagccguucaucauuuucuccaaccgccaugaaauc
cggcgcaucgaucuucacaaaggagacuacagcguccuggugcccggccugcgcaacaccaucgcccuggacuuccac
cucagccagagcgcccucuacuggaccgacgugguggaggacaagaucuaccgcgggaagcugcuggacaacggagc
ccugacuaguuucgaggugguugauucaguauggccuggccacacccgagggccuggcuguagacuggauugcaggc
aacaucuacugggugguggagaguaaccuggaucagaucgaggugggccaagcuggaugggacccuccggaccacccugcu
ggccggugacauugagcacccaagggcaaucgcacuggaucccccgggaugggauccuguuuuggacagacugggau
gccagccugccccgcauugaggcagccuccaugaguggggcuggggcgccgcaccgugcaccgggagaccggcucugg
gggcuggcccaacgggcucaccguggacuaccuggagaagcgcauccuuuggauugacgccaggucagaugccauu
uacucagcccguuacgacggcucuggccacauggaggugcuucggggacacgaguuccugucgcacccguuugcag
ugacgcuguacgggggggaggucuacuggacugacuggcgaacaaacacacuggcuaaggccaacaaguggaccggc
cacaaugucaccgugguacagaggaccaacacccagcccuuugaccugcagguguaccaccccucccgccagcccaug
gcucccaaucccugugaggccaaugggggccagggccccugcucccaccugugucucaucaacuacaaccggaccgu
guccugcgccugccccccaccucaugaagcuccacaaggacaacaccaccugcuaugaguuuaagaaguuccugcugua
cgcacgucagauggagauccgaggugugaccuggaugcucccuacuacaacuacaucaucuccuucacggugcccg
acaucgacaacgucacagugcuagacuacgaugcccgcgagcagcgugugguacuggucugacgugcggacacaggcc
aucaagcgggccuucaucaacggcacaggcguggagacagucgucucugcagacuugccaaaugcccacgggcuggc
uguggacuggguccucccgaaaccuguucuggacaagcuaugacaccaauaagaagcagaucaauguggcccggcugg
auggcuccuucaagaacgcaguggugcagggccuggagcagccccauggccuugucguccacccucugcgugggaa
gcucuacuggaccgauggugacaacaucagcauggccaacauggauggcagcaaucgcacccugcucuucaguggcc
agaagggccccguggggccuggcuauugacuucccugaaagcaaacucuacuggaucagcuccgggaaccauaccauc
aaccgcugcaaccuggaugggaguggggcuggaggucaucgaugccaugcggagccagcuggggcaaggccaccgcccu
ggccaucaugggggacaagcuguggugggcugaucaggugucggaaaagaugggcacaugcagcaaggcugacggc
ucgggcuccguggguccuucggaacagcaccacccuggugaugcacaugaaggucuaugacgagagcauccagcugga
ccauaagggcaccaaccccugcagugucaacaacgggugacugcucccagcucugccugcccacgucagagacgacccg
cuccugcaugugcacagccggcuauagccuccggaguggccagcaggccugcgagggcguagguuccuuucuccug
uacucugugcaugagggaaucaggggaauuccccuggaucccaaugacaagucagaugcccuggucccaguguccgg
gaccucgcuggcugucggcaucgacuuccacgcugaaaaugacaccaucuacuggguggacaugggccugagcacga
ucagccgggccaagcgggaccagacguggcgugaagacgugguugaccaauggcauuggccguguggagggcauugc
aguggacuggaucgcaggcaacaucuacuggacagaccagggcuuugaugucaucgaggucgcccggcucaauggc
uccuuccgcuacguggugaucucccagggucuagacaagccccgggccaucaccguccacccggagaaaggguacuu
guucuggacugaguggggucaguauccgcguauugagcggucucggcuagauggcacggagcguguggugcuggu

caacgucagcaucagcuggcccaacggcaucucaguggacuaccaggaugggaagcuguacuggugcgaugcacgga
cagacaagauugaacggaucgaccuggagacaggugagaaccgcgaggugguucuguccagcaacaacauggacaug
uuuucagugucuguguuugaggauuucaucuacuggagugacaggacucaugccaacggcucuaucaagcgcggga
gcaaagacaaugccacagacuccgugccccugcgaaccggcaucggcguccagcuuaaagacaucaaagucuucaacc
gggaccggcagaaaggcaccaacgugugcgcgguggccaauggcgggugccagcagcugugccuguaccggggccg
ugggcagcgggccugcgccugugcccacgggaugcuggcugaagacggagcaucgugccgcgaguaugccggcuac
cugcucuacucagagcgcaccauucucaagaguauccaccugucggaugagcgcaaccucaaugcgcccgugcagccc
uucgaggacccugagcacaugaagaacgucaucgcccuggccuuugacuaccgggcaggcaccucuccgggcacccc
caaucgcaucuucuucagcgacauccacuuugggaacauccaacagaucaacgacgauggcuccaggaggaucaccau
uguggaaaacgugggcuccguggaaggccuggccuaucaccguggcugggacacucucuauuggacaagcuacacg
acauccaccaucacgcgccacacaguggaccagacccgcccaggggccuucgagcgugagaccgucaucacuaugucu
ggagaugaccacccacgggccuucguuuuggacgagugccagaaccucauguucuggaccaacuggaaugagcagca
ucccagcaucaugcgggcggcgcucucgggagccaauguccugacccuuaucgagaaggacauccguacccccaaug
gccuggccaucgaccaccgugccgagaagcucuacuucucugacgccacccuggacaagaucgagcggugcgaguau
gacggcucccaccgcuaugugauccuaaagucagagccuguccacccccuucgggcuggccguguaugggagcacau
uuucuggacugacugggugcggcgggcagugcagcgggccaacaagcacgugggcagcaacaugaagcugcugcgc
guggacaucccccagcagcccaugggcaucaucgccguggccaacgacaccaacagcugugaacucucuccaugccga
aucaacaacgguggcugccaggaccugugucugcucacucaccagggccaugucaacugcucaugccgaggggccg
aauccuccaggaugaccucaccugccgagcggugaauuccucuugccgagcacaagaugaguuugagugugccaaug
gcgagugcaucaacuucagccugaccugcgacggcgucccccacugcaaggacaaguccgaugagaagccauccuacu
gcaacucccgccgcugcaagaagacuuuccggcagugcagcaaugggcgcugugugucccaacaugcuguggugcaac
ggggccgacgacuguggggauggcucugacgagaucccuugcaacaagacagccuguggugugggcgaguuccgcu
gccgggacgggaccugcaucgggaacuccagccgcugcaaccaguuuguggauugugaggacgccucagaugagau
gaacugcagugccaccgacugcagcagcuacuuccgccugggcgugaagggcgugcucuuccagcccugcgagcgga
ccucacucugcuacgcacccagcugggugugugauggcgccaaugacugugggacuacagugaugagcgcgacug
cccaggugugaaacgccccagaugcccucugaauuacuucgccugcccuagugggcgcugcaucccccaugagcugga
cgugugacaaagaggaugacugugaacauggcgaggacgagacccacugcaacaaguucugcucagaggcccaguuu
gagugccagaaccaucgcugcaucuccaagcaguggcugugugacggcagcgaugacuguggggauggcucagacg
aggcugcucacugugaaggcaagacgugcggccccuccuccuucuccugcccuggcacccacgugugcgucccgag
cgcuggcucugugacgguacaaagacugugcugauggugcagacgagagcaucgcagcugguugcuuguacaaca
gcacuugugacgaccgugaguucaugugccagaaccgccagugcaucccccaagcacuucgugugugaccacgaccgu
gacugugcagauggcucugaugaguccccgagugugaguacccgaccugcggccccagugaguuccgcugugcca
augggcgcugucugagcucccgccagugggagugugauggcgagaaugacugccacgaccagagugacgaggcucc
caagaacccacacugcaccagccaagagcacaagugcaaugccucgucacaguuccugugcagcaguggggcgcugug
uggcugaggcacugcucugcaacggccaggaugacuguggcgacagcucggacgagcguggcugccacaucaauga
gugucucagccgcaagcucaguggcugcagccaggacugugaggaccucaagaucggcuucaagugccgcugucgcc
cuggcuuccggcugaaggacgacggccggacgugugcugauguggacgagugcagcaccaccuucccccugcagccag
cgcugcaucaacacucauggcagcuauaaagugucuguguguggagggcuaugcaccccgcggcggcgacccccacag
cugcaaggcugugacugacgaggaaccguuucugaucuucgccaaccgguacuaccugcgcaagcucaaccuggacg
gguccaacuacacguuacuuaagcagggccugaacaacgccguugccuuggauuuugacuaccgagagcagaugauc
uacuggacagaugugaccacccagggcagcaugauccgaaggaugcaccuuaacgggagcaaugugcaggcccuaca
ccguacaggccucagcaaccccgaugggcuggcuguggacugggugggguggcaaccuguacuggugcgacaaaggc
cgggacaccaucgaggugcuccaagcucaaugggggccuaucggacggugcuggucagcucuggccuccgugagccca
gggcucuggugguggaugugcagaaugggguaccuguacuggacagacuggggugaccauucacugaucggccgcau
cggcauggaugggcuccagccgcagcgucaucguggacaccaagaucacauggcccaauggccugacgcuggacuaug
ucacugagcgcaucuacugggccgacgcccgcgaggacuacauugaauuugccagccuggauggcuccaaucgccac
guugugcugagccaggacaucccgcacaucuuugcacugacccuguuugaggacuacgucuacuggaccgacuggg

aaacaaaguccauuaaccgagcccacaagaccacgggcaccaacaaaacgcuccucaucagcacgcugcaccggcccau
ggaccugcaugucuuccaugcccugcgccagccagacgugcccaaucaccccugcaaggucaacaaugguggcugca
gcaaccugugccugcugucccccgggggagggcacaaaugugccugccccaccaacuucuaccugggcagcgauggg
cgcaccugugugguccaacugcacggcuagccaguuuguaugcaagaacgacaagugcaucccccuucugguggaagug
ugacaccgaggacgacugcggggaccacucagacgagccccccggacugcccugaguucaagugccggcccggacagu
uccagugcuccacagguaucugcacaaacccugccuucaucugcgauggcgacaaugacugccaggacaacagugac
gaggccaacugugacauccacgucugcuugcccagucaguucaaaugcaccaacaccaaccgcuguauucccggcauc
uuccgcugcaaugggcaggacaacugcggagaugggggaggaugagagggacugccccgaggugaccugcgccccaa
ccaguuccagugcuccauuaccaaacggugcaucccccgggucugggucugcgaccgggacaaugacugugguggau
ggcagugaugagcccgccaacugcacccagaugaccuguggugugga cgaguuccgcugcaaggauucgggccgcu
gcaucccagcgcguuggaagugugacggagaggaugacugugggggauggcucggaugagcccaaggaagaguguga
ugaacgcaccugugagccauaccaguuccgcugcaagaacaaccgcugcgugcccggccgcuggcagugcgacuacg
acaacgauugcgguga caacuccgaugaagagagcugcaccccucggcccugcuccgagagugaguucuccugugcc
aacggccgcugcaucgcggggcgcuggaaaugcgauggagaccacgacugcgcggacggcucggacgagaaagacug
cacccccgcugugacauggaccaguuccagugcaagagcggccacugcaucccccugcgcuggcgcugugacgcag
acgccgacugcauggacggcagcgacgaggaggccugcggcacuggcgugcggaccugccccuggacgaguuccag
ugcaacaacaccuugugcaagccgcuggccuggaagugcgauggcgaggaugacuguggggacaacucagaugagaa
ccccgaggagugugcccgguucgugugcccucccaaccggcccuuccguugcaagaaugaccgcgucugucugugg
aucgggcgccaaugcgauggcacggacaacuguggggaugggacugaugaagaggacugugagccccccacagccca
caccacccacugcaaagacaagaaggaguuucugugccggaaccagcgcugccucuccuccuccccugcgcugcaacau
guucgaugacugcggggacggcucugacgaggaggacugcagcaucgaccccaagcugaccagcugcgccaccaaug
ccagcaucuguggggacgaggcacgcugcgugcgcaccgagaaagcggccuacugugccugccgcucgggcuuccac
accgugcccggccagcccggaugccaagacaucaacgagugccugcgcuucggcaccugcucccagcucugcaacaac
accaagggcggccaccucugcagcugcgcucggaacuucaugaagacgcacaacaccugcaaggccgaaggcucugag
uaccaggcccuguacaucgcugaugacaaugagauccgcagccuguucccc ggccacccccauucggcuuacgagca
ggcauuccagggugacgagaguguccgcauugaugcuauggauguccaugucaaggcuggccgugucuauuggacc
aacuggcacacgggcaccaucuccuaccgcagccugccaccugcugcgccuccuaccacuuccaaccgccaccggcga
cagauugaccgggguucacccaccucaacauuucagggcugaagaugcccagaggcaucgccaucgacuggguggc
cggaaacguguacuggaccgacucgggccgagaugugauugagguggcgcagaugaagggcgagaaccgcaagacg
cucaucucgggcaugauugacgagccccacgccauuguggguggacccacugaggggaccauguacuggucagacu
ggggcaaccaccccaagauugagacggcagcgauggaugggacgcuucgggagacacuggugcaggacaacauucag
uggcccacaggccuggccguggauuaucacaaugagcggcuguacugggcagacgccaagcuuucagucaucggcag
cauccggcucaauggcacggaccccauuguggcugcugacagcaaacgaggccuaagucaccccuucagcaucgacg
ucuuugaggauuacaucuauggugucaccuacaucaauaaucgugucuucaagauccauaaguuuggccacagcccc
uuggucaaccugacaggggccugagccacgccucugacgugguccuuuaccaucagcacaagcagcccgaagugac
caacccaugugaccgcaagaaaugcgaguggcucugccugcugagccccaguggg ccugucugcaccugucccaaug
ggaagcggcuggacaacggcacaugcgugccugugcccucuccaacgcccccccc agaugcucccc ggccuggaaccu
guaaccugcagugcuucaacgguggcagcuguuuccucaaugcacggaggcagcccaagugccgcugccaaccccgc
uacacgggugacaaguguga acuggaccagugcugggagcacugucgcaaugggggcaccugugcugccucccccu
cuggcaugcccacgugccgguguccccacgggcuucacgggccccaaaugcacccagcaggugugugcgggcuacugu
gccaacaacagcaccugcacugucaaccagggcaaccagccccaguguccgaugccuacccggcuuccuggggcgaccgc
ugccaguaccggcagugcucuggcuacugugagaacuuuggcacaugccagauggcugcugauggcucccgacaau
gccgcugcacugccuacuuugagggaucgaggugugaggugaacaagugcagccgcugucucgaaggggccugugu
ggucaacaagcagaguggggaugucaccugcaacugcacggauggccgggugguggccccagcugucugaccugcguc
ggccacugcagcaauggcggcuccuguaccaugaacagcaaaaugaugccugagugccagugcccaccccacaugaca
gggccccggugugaggagcacgucuucagccagcagcagccaggacauauagccuccauccuaaucccucugcuguu
gcugcugcugcugguucugguggccggaguggguauucugguauaagcggcgaguccaaggggcuaagggcuucca

gcaccaacggaugaccaacggggccaugaacguggagauuggaaaccccaccuacaagauguacgaaggcggagagcc
ugaugauguggggaggccuacuggacgcugacuuugccccuggacccugacaagcccaccaacuucaccaaccccgugu
augccacacucuacauggggggccauggcagucgccacucccuggccagcacggacgagaagcgagaacuccuggggc
cggggccccugaggacgagauaggggaccccuuggcauagggcccugccccgucggacugccccccagaaagccuccug
ccccccugccggugaaguccuucagugagccccucccccagccagcccuucccuggccccgccggauguauaaaauguaaa
aaugaaggaauuacauuuuauaugugagcgagcaagccggcaagcgagcacaguauuauuucuccaucccccucccug
ccugcuccuuggcacccccaugcugccuucagggagacaggcagggagggcuuggggcugcaccuccuacccucccca
ccagaacgcaccccacugggagagcuggugggugcagccuucccccucccuguauaagacacuuugccaaggcucuccc
cucucgccccaucccugcuugcccgcucccacagcuuccugagggcuaaauucugggaagggagaguucuuugcugcc
ccugucuggaagacguggcucugggugagguaggcgggaaaggauggaguguuuuaguucuuggggggaggccacc
ccaaaccccagccccaacuccaggggcaccuaugagauggccaugcucaacccccccucccagacaggcccucccuguc
uccagggcccccaccgaggguucccagggcuggagacuuccucugguaaacauuccuccagccucccccucccccugggg
acgccaaggaggugggccacacccaggaagggaaagcgggcagccccguuuuggggacgugaacguuuuaauaauu
uuugcugaauuccuuuacaacuaaauaacacagauauuguuauaaauaaaauuguaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

LRP1 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10)

mltpplllll pllsalvaaa idapktcspk qfacrdqitc iskgwrcdge rdcpdgsdea peicpqskaq rcqpnehncl
gtelcvpmsr lcngvqdcmd gsdegphcre lqgncsrlgc qhhcvptldg ptcycnssfq lqadgktckd
fdecsvygtc sqlctntdgs ficgcvegyl lqpdnrscka knepvdrppv lliansqnil atylsgaqvs titptstrqt
tamdfsyane tvcwvhvgds aaqtqlkcar mpglkgfvde htinislslh hveqmaidwl tgnfyfvddi
ddrifvcnrn gdtcvtlldl elynpkgial dpamgkvfft dygqipkver cdmdgqnrtk lvdskivfph gitldlvsrl
vywadayldy ievvdyegkg rqtiiqgili ehlygltvfe nylyatnsdn anaqqktsvi rvnrfnstey qvvtrvdkgg
alhiyhqrrq prvrshacen dqygkpggcs dicllanshk artcrcrsgf slgsdgksck kpehelflvy gkgrpgiirg
mdmgakvpde hmipienlmn praldfhaet gfiyfadtts yligrqkidg teretilkdg ihnvegvavd
wmgdnlywtd dgpkktisva rlekaaqtrk tliegkmthp raivvdplng wmywtdweed pkdsrrgrle
rawmdgshrd ifvtsktvlw pnglsldipa grlywvdafy drietillng tdrkivyegp elnhafglch hgnylfwtey
rsgsvyrler gvggapptvt llrserppif eirmydaqqq qvgtnkcrvn nggcsslcla tpgsrqcaca edqvldadgv
tclanpsyvp ppqcqpgefa cansrciqer wkcdgdndcl dnsdeapalc hqhtcpsdrf kcennrcipn
rwlcdgdndc gnsedesnat csartcppnq fscasgrcip iswtcdlddd cgdrsdesas cayptcfplt qftcnngrci
ninwrcdndn dcgdnsdeag cshscsstqf kcnsgrcipe hwtcdgdndc gdysdethan ctnqatrppg
gchtdefqcr ldglciplrw rcdgdtdcmd ssdekscegv thvcdpsvkf gckdsarcis kawvcdgdnd
cednsdeenc eslacrppsh pcanntsvcl ppdklcdgnd dcgdgsdege lcdqcslnng gcshncsvap
gegivcscpl gmelgpdnht cqiqsycakh lkcsqkcdqn kfsvkcscye gwvlepdges crsldpfkpf
iifsnrheir ridlhkgdys vlvpglrnti aldfhlsqsa lywtdvvedk iyrgklldng altsfevviq yglatpegla
vdwiagniyw vesnldqiev akldgtlrtt llagdiehpr aialdprdgi lfwtdwdasl prieaasmsg agrrtvhret
gsggwpnglt vdylekrilw idarsdaiys arydgsghme vlrgheflsh pfavtlygge vywtdwrtnt
lakankwtgh nvtvvqrtnt qpfdlqvyhp srqpmapnpc eanggqgpcs hlclinynrt vscacphlmk
lhkdnttcye fkkfllyarq meirgvdlda pyynyiisft vpdidnvtvl dydareqrvy wsdvrtqaik rafingtgve
tvvsadlpna hglavdwvsr nlfwtsydtn kkqinvarld gsfknavvqg leqphglvvh plrgklywtd
gdnismanmd gsnrtllfsg qkgpvglaid fpesklywis sgnhtinrcn ldgsglevid amrsqlgkat
alaimgdklw wadqvsekmg tcskadgsgs vvlrnsttlv mhmkvydesi qldhkgtnpc svnngdcsql
clptsettrs cmctagyslr sgqqacegvg sfllysvheg irgipldpnd ksdalvpvsg tslavgidfh aendtiywvd
mglstisrak rdqtwredvv tngigrvegi avdwiagniy wtdqgfdvie varlngsfry vvisqgldkp
raitvhpekg ylfwtewgqy priersrldg tervvlvnvs iswpngisvd yqdgklywcd artdkierid
letgenrevv lssnnmdmfs vsvfedfiyw sdrthangsi krgskdnatd svplrtgigv qlkdikvfnr
drqkgtnvca vanggcqqlc lyrgrgqrac acahgmlaed gascreyagy llysertilk sihlsdernl
napvqpfedp ehmknviala fdyragtspg tpnriffsdi hfgniqqind dgsrritive nvgsveglay

hrgwdtlywt syttstitrh tvdqtrpgaf eretvitmsg ddhprafvld ecqnlmfwtn wneqhpsimr aalsganvlt liekdirtpn glaidhraek lyfsdatldk ierceydgsh ryvilksepv hpfglavyge hifwtdwvrr avqrankhvg snmkllrvdi pqqpmgiiav andtnscels pcrinnggcq dlcllthqgh vncscrggri lqddltcrav nsscraqdef ecangecinf sltcdgvphc kdksdekpsy cnsrrckktf rqcsngrcvs nmlwcngadd cgdgsdeipc nktacgvgef rcrdgtcign ssrcnqfvdc edasdemncs atdcssyfrl gvkgvlfqpc ertslcyaps wvcdgandcg dysderdcpg vkrprcplny facpsgrcip mswtcdkedd cehgedethc nkfcseaqfe cqnhrciskq wlcdgsddcg dgsdeaahce gktcgpssfs cpgthvcvpe rwlcdgdkdc adgadesiaa gclynstcdd refmcqnrqc ipkhfvcdhd rdcadgsdes peceyptcgp sefrcangrc lssrqwecdg endchdqsde apknphctsq ehkcnassqf lcssgrcvae allcngqddc gdssdergch ineclsrkls gcsqdcedlk igfkcrcrpg frlkddgrtc advdecsttf pcsqrcinth gsykclcveg yaprggdphs ckavtdeepf lifanryylr klnldgsnyt llkqglnnav aldfdyreqm iywtdvttqg smirrmhlng snvqvlhrtg lsnpdglavd wvggnlywcd kgrdtievsk lngayrtvlv ssglrepral vvdvqngyly wtdwgdhsli grigmdgssr svivdtkitw pngltldyvt eriywadare dyiefasldg snrhvvlsqd iphifaltlf edyvywtdwe tksinrahkt tgtnktllis tlhrpmdlhv fhalrqpdvp nhpckvnngg csnlcllspg gghkcacptn fylgsdgrtc vsnctasqfv ckndkcipfw wkcdteddcg dhsdeppdcp efkcrpgqfq cstgictnpa ficdgdndcq dnsdeancdi hvclpsqfkc tntnrcipgi frcngqdncg dgederdcpe vtcapnqfqc sitkrciprv wvcdrdndcv dgsdepanct qmtcgvdefr ckdsgrcipa rwkcdgeddc gdgsdepkee cdertcepyq frcknnrcvp grwqcdydnd cgdnsdeesc tprpcsesef scangrciag rwkcdgdhdc adgsdekdct prcdmdqfqc ksghciplrw rcdadadcmd gsdeeacgtg vrtcpldefq cnntlckpla wkcdgeddcg dnsdenpeec arfvcppnrp frckndrvcl wigrqcdgtd ncgdgtdeed cepptahtth ckdkkeflcr nqrclssslr cnmfddcgdg sdeedcsidp kltscatnas icgdearcvr tekaaycacr sgfhtvpgqp gcqdineclr fgtcsqlcnn tkgghlcsca rnfmkthntc kaegseyqvl yiaddneirs lfpghphsay eqafqgdesv ridamdvhvk agrvywtnwh tgtisyrslp paappttsnr hrrqidrgvt hlnisglkmp rgiaidwvag nvywtdsgrd vievaqmkgc nrktlisgmi dephaivvdp lrgtmywsdw gnhpkietaa mdgtlretlv qdniqwptgl avdyhnerly wadaklsvig sirlngtdpi vaadskrgls hpfsidvfed yiygvtyinn rvfkihkfgh splvnltggl shasdvvlyh qhkqpevtnp cdrkkcewlc llspsgpvct cpngkrldng tcvpvpsptp ppdaprpgtc nlqcfnggsc flnarrqpkc rcqprytgdk celdqcwehc rnggtcaasp sgmptcrcpt gftgpkctqq vcagycanns tctvnqgnqp qcrclpgflg drcqyrqcsg ycenfgtcqm aadgsrqcrc tayfegsrce vnkcsrcleg acvvnkqsgd vtcnctdgrv apscltcvgh csnggsctmn skmmpecqcp phmtgprcee hvfsqqqpgh iasiliplll llllvlvagv vfwykrrvqg akgfqhqrmt ngamnveign ptykmyegge pddvggllda dfaldpdkpt nftnpvyatl ymgghgsrhs lastdekrel lgrgpedeig dpla

LRP8 isoforma 1 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 11)

gcuggcggcggccgcccagggccggggccgcgcgcccagccugagcccgccccgccgccgagcgucaccgaaccugc
uugaaaaugcagccgaggagccggggcgggcggcagcggcggcggcggcggcggcgggggcagcggcaaccccggcg
ccgcggcaaggacucggagggcugagacgcggcggcggcggcgcggggagcgcggggcgcggcggccggagccccg
ggcccgccaugggccucccccgagccgggcccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcu
gcugcagcuccagcaucuugcggcggcagcggcugauccgcugcucggcggccaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcaucccccucugugguggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacgguggaaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuccgaugaguccgaggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcuguggacccaccagccacaaaguguguaccugccucguggcgcugcgacgggga
gaaggacugcgaggguggagcggaugaggccggcugugcuaccuugugcgcccccgcacgaguuccagugcggcaac
cgcucgugccuggccgccguguucgugugcgacggcgacgacgacuguggugacggcagcgaugagcgcggcugug
cagacccggccugcgggccccgcgaguuccgcugcggcggcgauggcggcggcgccugcaucccggagcgcuggggu
cugcgaccgccaguuugacugcgaggaccgcucggacgaggcagccgagcucugcggccguccgggccccggggcca
cguccgcgcccgccgccugcgccaccgccucccaguucgccugccgcagcggcgagugcgugcaccugggcuggcgc

ugcgacggcgaccgcgacugcaaagacaaaucggacgaggccgacugcccacugggcaccugccgugggacgaguu
ccaguguggggaugggacaugugcccuugcaaucaagcacugcaaccaggagcaggacuguccagaugggagugau
gaagcuggcugccuacaggggcugaacgagugucugcacaacaauggcggcugcucacacaucugcacugaccucaa
gauuggcuuugaaugcacgugcccagcaggcuuccagcuccuggaccagaagaccuguggcgacauugaugagugc
aaggacccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuuaagugugagugcuacccuggcuacga
gauggaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcuggcaagagcccaucccuaaucuucaccaaccggcacgaggu
gcggaggaucgaccuggugaagcggaacuauucacgccucauccccaugcucaagaaugucguggcacuagaugugg
aaguugccaccaaucgcaucuacuggugugaccucuccuaccguaagaucuauagcgccuacauggacaaggccagu
gacccgaaagagcaggaggcccucauugacgagcaguugcacucuccagagggccuggcaguggacuggguccacaa
gcacaucuacuggacugacucgggcaauaagaccaucucaguggccacaguugaugguggccgccgacgcacucucu
ucagccguaaccucagugaaccccgggccaucgcuguugacccccugcgaggguucauguauuggucugacugggg
ggaccaggccaagauugagaaaucugggcucaacgguguggaccggcaaacacuggugucagacaauauugaauggc
ccaacggaaucacccuggaucugcugagccagcgcuuguacuggguagacuccaagcuacaccaacuguccagcauu
gacuucaguggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccugagccacccuuuugggauagcuguguu
ugaggacaaggguguucuggacagaccuggagaacgaggccauuuucagugcaaaucggcucaauggccuggaaauc
uccauccuggcugagaaccucaacaacccacaugacauugucaucuuccaugagcugaagcagccaagagcuccagau
gccugugagcugaguguccagccuaauggaggcugugaauaccugugccuuccugcuccucagaucuccagccacuc
ucccaaguacacaugugccuguccugacacaauguggcuggguccagacaugaagaggugcuaccgagcaccucaau
cuaccucaacuacgacguuagcuucuaccaugacgaggacaguaccugccaccacaagagccccgggaccaccgucc
acagauccaccuaccagaaccacagcacagagacaccaagccugacagcugcagucccaagcucaguuaguguccca
gggcucccagcaucagcccgucuacccuaagcccugcaaccagcaaccacucccagcacuaugcaaaugaagacagua
agaugggcucaacagucacugccgcuguuaucgggaucaucgugcccauaguggugauagcccuccugugcaugag
uggauaccugaucuggagaaacuggaagcggaagaacaccaaaagcaugaauuuugacaacccagucuacaggaaaac
aacagaagaagaagacgaagaugagcuccauauagggagaacugcucagauuggccaugucuauccugcagcaauca
gcagcuuugaucgcccacuguggcagagcccugucuuggggagaccagagaaccggaagacccagccccugcccuc
aaggagcuuuuugucuugccgggggaaccaaggucacagcugcaccaacucccgaagaacccucuuuccgagcugcc
ugucgucaaauccaagcgaguggcauuaagccuugaagaugauggacuacccugaggaugggaucacccccuucgug
ccucauggaauucaguccccaugcacuacacucuggaugguguaugacuggaugaaugggguuucuauauaugggucu
gugugaguguaugugugugugugauuuuuuuuuuuaaauuuauguugcggaaagguaaccacaaaguuaugaugaa
cugcaaacauccaaaggaugugagaguuuuucuauguauaauguuuuauacacuuuuuaacugguugcacuaccca
ugaggaauucguggaauggcuacugcugacuaacaugaugcacauaaccaaaugggggccaauggcacaguaccuua
cucaucauuuaaaaacuauauuuacagaagauguuugguugcuggggggggcuuuuuuagguuuuggggcauuugu
uuuuuguaaaauaagaugauuaugcuuuguggcuauccaucaacauaaguaaaaaaaaaaaaaaaacacuucaacuccc
ucccccauuuagauuauuuauuaacauauuuuaaaaaucagaugaguucuauaaaauaauuuagagaagugagaguau
uuauuuuuggcauguuuggcccaccacacagacucugugugguauguguguuuauauguguaugugugugac
agaaaaaucuguagagaagaggcacaucuauggcuacuguucaaauacauaaagauaaauuuauuuucacacagucc
acaaggguauaucuuguaguuuucagaaaagccuuuggaaaucuggaucagaaaauagauaccaugguuugugca
auuauguaguaaaaaaggcaaaucuuuucaccucuggcuauuccugagaccccaggaagucaggaaaagccuuucag
cucacccauggcugcugugacuccuaccagggcuuucuuggcuuuggcgaaggucaguguacagacauuccauggu
accagagugcucagaaacucaagauaggauaugccucacccucagcuacuccuuguuuuaaaguucagcucuuugag
uaacuucuucaauuucuuucaggacacuuggguugaauucaguaaguuuccucugaagcacccugaagggugccau
ccuuacagagcuaaguggagacguuuccagaucagcccaaguuuacuauagagacuggcccaggcacugaaugucua
ggacaugcuguggaugaagauaaagaugguggaauagguuuuaucacaucucuuauuucucuuuuccccuuacucu
cuaccauuuccuuuauguggggaaacauuuuaagguaauaaauagguuacuuaccaucauauguucauauagauga
aacuaauuuuuggcuuaagucagaacaacuggccaaaauugaagucauauuugaggggggaaauggcauacgcaaua
uuauauuauauuggauauuuauguucacacaggaauuuggguuuacugcuuuguaaauaaaaggaaaaacuccgggu
auauguauagauguucuucauuauagacaucuucuuugcuuuucuuggccuuggggggaggaagggagaagugcuc

uuuucuacuuguggggucucccauuggaaacauaauccuauagucccagaaggauucagucccaguggcuuuccca
uccaaagagaaagaguuugaguuucuuaacucugcuguucugccacuuacucccacuagacaaccagggacaaggug
caacauggaaguguuugacuuaaguaggagcagaggagcugcaucuaaucucaucauaccuggaacuugacacacuu
aagcaaaugccuucccaucccuaccugccagaugccccaacucaaugaaguuggaugucucaccagcuugauacccu
uugaauuuucagucagacauucuggaguucuagcauccuguaccuaggaccuuccucugugucacucuuggccucc
uaaacucuaagaaaauaacuauauucuggagcuugggcaguguguuuugcauaauccagcaaucuccucaugacaug
caugugguugauaguccugaaacauucauugagagggguaaaugcaguugaccuagaaugaccaauaccaaacagaauu
uuaagaacaggugggccaacuccuauggagcuuacucacauauuacuauucuuuuaagaacggaaaguaaaauuauuu
uugacugaagaaaaaugaugacagugaaaaacauggaaauguacucaaaacaagugacuuuuucuguaaccuuccaa
agaaacugaauuuuccaaggaauuaaaugauaacaguggcuaaggcauaguuucuaaacuuucaguaagauccuggc
auucacagaaaaaaaugaugaauggggucuggacauacagccugagaucucaaaaugacaaugaaauucacaacuuu
uucucagagacauucauguuuccugcauaugcuacaacugcaguuugaaagaggcagcaaugggagcaacccuuuac
aagaaacaaauugugauauauucauguguuggacggcaguaaauaagaugaaaccugaggagucagauccaccuucc
cccauucauagaggcuuuucagccucauuuugagguacaguuacauaucuuuugccuuuugccccgugcauagcu
aucuacagccaaucacagaucacagagucacuggacuauagagcuggaaggaagcucagagacaaugccaaggggca
gaaaauuuaucagaagccagucccagugcguuuccuccauuuccuucugcaggaagacuauuuugggcugccugaac
auuguaucaaaccugcuaccuauacuaugucuaccuuuccuccaguggaauuacaaaggcacuaacugaaaugccu
ucuagaaacagagaaaacgaaacuguacuuauuuacucuugauacacagauuauuuauaaaacagauugaaguaacc
uguuaacuggcaaaaagagaaugagaucggauuuaaauguauggcaguaaguccuauugaucccuccaguuaucuca
guaugacugcaguauauucauucacuaaaaccacucacuagauaccaacuacacaccuggcacugcagauguaaaggu
cagucacacauguucugacuuuacagaguucacaguagcaguggaggaugauauauguggaaacaaaaaaggcauug
auucuauucagagcacuguuagggcucaaaggagagaggggucuuuccaccuaagaaaugaggaauagggucauca
uagaagugaccuuaagucuuaaaaauuaagaaggggauuccaagcugcuucagacagagacacaucgagcuaaaacac
agagguaugaaagagcacagggacuuuaggaauugcacaguucauucuaacaggaacaaaaggcucaaggggggcaa
gaaaugaggcuguauggaaagagauucaauguaagcacuuuauaaaaauagauuaauuucugauucaaugaagcauu
ucuugaucauuguguacaaggcacuacaugcaucauggaaaauucauuaggaugcauugccagcacuuugcagaacu
gauauuauucagccucaagcuuuccaguggccaaagggaaaugcugacugcuuuucauauauuugagucaaagauu
uuuuauauggucaaugaagacuaauauaagggcagugggauuuucacagaugcaugccauguugucgagagccucu
uagauuuucucaacugugagaaagaaaaacgaaaauguugaagacguugagucuggagaggggauacuaaucacug
uccaguugggcacuggugggaaugggaaauggcacaggaaugcaagccucuccacccuacccccgaacuccagcc
auacacucaucguuucacaaaauauaaaugaguuagcauuaaauguuucagaguaaauaauuccuuuucccgaaaug
caugaagauagaguaacagacuucucacacuguauuuuuaggguauggagaauuuagaagguuaaagaauuacugc
uucaauuuuucaguuaaaaaaaaaaucaggaagcucuguucauucaggcuaugcaccaugugcacagucaagaauuag
cagaaacccucugcauuuacaaacacuuugugcuauaaaaaaguaauuuuuuaaaaagccacgugugugugugguau
auauauauauauauauauauuuaaagccaaggguuuugauacuuuuuuacaaaaacuacaagagaaaacaaauauacc
uguccaaaccauauacuuuuaaaagagcauuuuuuuuuuccauacaagcuguuguuaauuuggggguaaagugcuga
uuugcaaacuucaucaaauuguucccaaguggauucuccuuguuugucucccccuaccaaccccaaaguuaccauau
uugauguaagaaucaggcauguuagaauguugugucacacuaacugauucugcucuuuuugucuugucauucaagu
uccguuagcuucuguacgcggugcccuuugcagucuggugucucuuccagaggcgaggggcugaggaugggggug
cugcaucucacuagcuauacuggcaucaucuugguaaacugaaaaccaaauguggacauuuguaaaaaucagugcacu
guuucuagagagagauuaaaauucauuuaaaaaaaa

LRP8 isoforma 1 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12)

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcrnerci psvwrcdedd dcldhsdedd
cpkktcadsd ftcdnghcih erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatlcaph efqcgnrscl aavfvcdgdd dcgdgsderg cadpacgpre frcggdggga
ciperwvcdr qfdcedrsde aaelcgrpgp gatsapaaca tasqfacrsg ecvhlgwrcd gdrdckdksd
eadcplgtcr gdefqcgdgt cvlaikhcnq eqdcpdgsde agclqglnec lhnnggcshi ctdlkigfec tcpagfqlld
qktcgdidec kdpdacsqic vnykgyfkce cypgyemdll tknckaaagk spsliftnrh evrridlvkr
nysrlipmlk nvvaldveva tnriywcdls yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwvhkh
iywtdsgnkt isvatvdggr rrtlfsrnls epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksgl ngvdrqtlvs
dniewpngit ldllsqrlyw vdsklhqlss idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrlngl
eisilaenln nphdivifhe lkqprapdac elsvqpnggc eylclpapqi sshspkytca cpdtmwlgpd
mkrcyrapqs tstttlastm trtvpattra pgttvhrsty qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lspatsnhsq
hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall cmsgyliwrn wkrkntksmn fdnpvyrktt eeededelhi
grtaqighvy paaissfdrp lwaepclget repedpapal kelfvlpgep rsqlhqlpkn plselpvvks krvalsledd
glp

LRP8 isoforma 2 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 13)

gcuggcggcggccgcccagggccggggccgcgcgcccagccugagcccgccccgccgccgagcgucaccgaaccugc
uugaaaugcagccgaggagccggggcgggcggcagcggcggcggcggcggcggcgggggcagcggcaaccccggcg
ccgcggcaaggacucggagggcugagacgcggcggcggcggcgcggggagcgcggggcgcggcggccggagccccg
ggcccgccaugggccucccgagccgggcccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcu
gcugcagcuccagcaucuugcggcggcagcggcugauccgcugcucggcggccaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcaucccccucuguguggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacgguggaaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuccgaugaguccgaggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcuguggacccaccagccacaaguguguaccugccucguggcgcugcgacggggga
gaaggacugcgaggguggagcggaugaggccggcugugcuaccuggcugaacgagugucugcacaacaauggcggc
ugcucacacaucugcacugaccucaagauuggcuuugaaugcacgugcccagcaggcuuccagcuccuggaccagaa
gaccuguggcgacauugaugagugcaaggacccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuu
aagugugagugcuacccuggcuacgagauggaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcuggcaagagcccauc
ccuaaucuucaccaaccggcacgaggugcggaggaucgaccuggugaagcggaacuauucacgccucaucccccaugc
ucaagaaugucguggcacuagauguggaaguugccaccaaucgcaucuacuggugugaccucuccuaccguaagauc
uauagcgccuacauggacaaggccagugacccgaaagagcaggagguccucauugacgagcaguugcacucuccaga
gggccuggcaguggacuggguccacaagcacaucuacuggacugacucgggcaauaagaccaucucaguggccacag
uugauggugccgccgacgcacucucuucagccguaaccucagugaaccccgggccaucgcuguugacccccugcga
ggguucauguauuggucugacuggggggaccaggccaagauugagaaaucugggcucaacgguguggaccggcaaa
cacuggugucagacaauauugaauggcccaacggaaucacccuggaucugcugagccagcgcuuguacuggguagac
uccaagcuacaccaacuguccagcauugacuucaguggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccug
agccacccuuuugggauagcuguguuugaggacaagguguucuggacagaccuggagaacgaggccauuuucagug
caaaucggcucaauggccuggaaaucuccauccuggcugagaaccucaacaacccacaugacauugucaucuuccaug
agcugaagcagccaagagcuccagaugccugugagcugaguguccagccuaauggaggcugugaauaccugugccu
uccugcuccucagaucuccagccacucucccaaguacacaugugccuguccugacacaauguggcuggguccagaca
ugaagaggugcuaccgagcaccucaaucuaccucaacuacgacguuagcuucuaccaugacgaggacaguaccugcca
ccacaagagccccgggaccaccguccacagauccaccuaccagaaccacagcacagagacaccaagccugacagcugc
agucccaagcucaguuaguguccccagggcucccagcaucagcccgucuacccuaagcccugcaaccagcaaccacuc
ccagcacuaugcaaaugaagacaguaagaugggcucaacagucacugccgcuguuaucgggaucaucgugcccauag
uggugauagcccuccugugcaugaguggauaccugaucuggagaaacuggaagcggaagaacaccaaaagcaugaau

uuugacaacccagucuacaggaaaacaacagaagaagaagacgaagaugagcuccauauagggagaacugcucagauu
ggccaugucuauccugcagcaaucagcagcuuugaucgcccacuguggggcagagcccugucuuggggagaccagaga
accggaagacccagccccugcccucaaggagcuuuuugucuugccgggggaaccaaggucacagcugcaccaacuccc
gaagaacccucuuuccgagcugccugucgucaaauccaagcgaguggcauuaagccuugaagaugauggacuacccu
gaggaugggaucacccccuucgugccucauggaauucagucccaugcacuacacucuggaugguguaugacuggau
gaaugggguuucuauauaugggucugugugaguguaugugugugugugauuuuuuuuuuuaaauuuauguugcgga
aagguaaccacaaaguuaugaugaacugcaaacauccaaaggaugugagaguuuuucuauguauaaauguuuuauaca
cuuuuuaacugguugcacuacccaugaggaauucguggaauggcuacugcugacuaacaugaugcacauaaccaaau
gggggccaauggcacaguaccuuacucaucauuuaaaaacuauauuuacagaagauguuugguugcuggggggcu
uuuuuagguuuuggggcauuuguuuuuuguaaauaagaugauuaugcuuuguggcuauccaucaacauaaguaaa
aaaaaaaaaaaaacacuucaacucccucccccauuuagauuauuuauuaacauauuuuaaaaaucagaugaguucuau
aaauaauuuagagaagugagaguauuuauuuuuggcauguuuggcccaccacacagacucugugugguauguguug
uguuuauaugguguaugugugugacagaaaaaucuguagagaagaggcacaucuauggcuacuguucaaauacauaa
agauaaauuuauuuucacacaguccacaaggguauaucuuguaguuuucagaaaagccuuuggaaaucuggauca
gaaaauagauaccaugguuugugcaauuauguaguaaaaaaggcaaaucuuuucaccucuggcuauuccugagaccc
caggaagucaggaaaagccuuucagcucacccauggcugcugugacuccuaccagggcuuucuuggcuuuggcgaa
ggucaguguacagacauuccaugguaccagagugcucagaaacucaagauaggauaugccucacccucagcuacucc
uuguuuuaaaguucagcucuuugaguaacuucuucaauuucuuucaggacacuuggguugaauucaguaaguuucc
ucugaagcacccugaagggugccauccuuacagagcuaaguggagacguuuccagaucagcccaaguuuacuauaga
gacuggcccaggcacugaaugucuaggacaugcuguggaugaagauaaagaugguggaauagguuuuaucacaucu
cuuauuucucuuuucccccuuacucucuaccauuuccuuuauguggggaaacauuuuaagguaauaaaauagguuacu
uaccaucauauguucauauagaugaaacuaauuuuuuggcuuaagucagaacaacuggccaaaauugaagucauauuu
gaggggggaaauggcauacgcaauauuauauuauauuggauauuuauguucacacaggaauuuggguuuacugcuuu
guaaauaaaaggaaaaacuccggguauauguauagauguucuucauuauagacaucuucuuugcuuuucuuggccu
ugggggaggaagggagaagugcucuuuucuacuuguggggucucccauuggaaacauaaauccuauagucccagaag
gauucaguccccaguggcuuucccauccaaagagaaagaguuugaguuucuuaacucugcuguucugccacuuacuc
ccacuagacaaccagggacaaggugcaacauggaaguguuugacuuaaguaggagcagaggagcugcaucuaaucuc
aucauaccuggaacuugacacacuuaagcaaaugccuucccaucccuaccugccagaugccccaacucaaugaaguu
ggaugucucaccagcuugauacccuuugaauuuucagucagacauucuggaguucuagcauccuguaccuaggacc
uuccucugugucacucuuggccuccuaaacucuaagaaaauaacuauauucuggagcuugggcaguguguuuugca
uaauccagcaaucuccucaugacaugcauguguugauaguccugaaacauucauugagaggguaaaugcaguugacc
uagaaugaccaauaccaaacagaauuuuaagaacaggugggccaacuccuauggagcuuacucacauauuacuauucu
uuuaagaacggaaaguaaaauuauuuuugacugaagaaaaaugaugacagugaaaaacauggaaauguacucaaaac
aagugacuuuuucuguaaccuuccaaagaaacugaauuuuccaaggaauuaaaugauaacaguggcuaaggcauagu
uucuaaacuuucaguaagauccuggcauucacagaaaaaaaugaugaaugggucuggacauacagccugagaucuc
aaaaugacaaugaaauucacaacuuuuucucagagacauucauguuuccugcauaugcuacaacugcaguuugaaag
aggcagcaaugggagcaacccuuuacaagaaacaaauugugauauauucauguguuggacggcaguaaauaagauga
aaccugaggagucagauccaccuucccccauucauagaggcuuuucagccucauuuugagguacaguuacauaucuu
uugccuuuugccccgugcauagcuaucuacagccaaucacagaucacagagucacuggacuauagagcuggaagga
agcucagagacaaugccaaggggcagaaaauuuaucagaagccagucccagugcguuuccuccauuuccuucugca
ggaagacuauuuugggcugccugaacauuguaucaaaccugcuaccuauacuauggucuaccuuuccuccaguggaa
uuacaaaggcacuaacugaaaugccuucuagaaacagagaaaacgaaacuguacuuauuuacucuugauacacagauu
auuuauaaaacagauugaaguaaccuguuaacuggcaaaaagagaaugagaucggauuuaaauguauggcaguaagu
ccuauugaucccuccaguuaucucaguaugacugcaguauauucauucacuaaaaccacucacuagauaccaacuaca
caccuggcacugcagauguaaaggucagucacacauguucugacuuuacagaguucacaguagcaguggaggaugau
auauguggaaacaaaaaaggcauugauucuauucagagcacuguuagggcucaaaggagagaggggucuuuccaccu
aagaaaugaggaauagggucaucauagaagugaccuuaagucuuaaaaauuaagaaggggauuccaagcugcuucag

acagagacacaucgagcuaaaacacagagguaugaaagagcacagggacuuuaggaauugcacaguucauucuaacag
gaacaaaaggcucaagggggggcaagaaaugaggcuguauggaaagagauucaauguaagcacuuuauaaaaauagauu
aauuucugauucaaugaagcauuucuugaucauuguguacaaggcacuacaugcaucauggaaaauucauuaggau
gcauugccagcacuuugcagaacugauauuauucagccucaagcuuuccaguggccaaagggaaaugcugacugcuu
uucauauauuugagucaaagauuuuuuauauggucaaugaagacuaauauaagggcaguggggauuuucacagaugc
augccauguugucgagagccucuuagauuuucucaacugugagaaagaaaaacgaaaauguugaagacguugaguc
uggagaggggauacuaaucacuguccaguuggcacuggugggaaugggaaauggcacaggaaugcaagccucuc
cacccuacccccgaacuccagccauacacucaucguuucacaaaauauaaaaugaguuagcauuaaaauguuucagagu
aaauaauuccuuuucccgaaaugcaugaagauagaguaacagacuucucacacuguauuuuuaggguauggagaauu
uagaaggguuaaagaauuacugcuucaauuuuucaguuaaaaaaaaaaucaggaagcucuguucauucaggcuaugcac
caugugcacagucaagaauuagcagaaacccucugcauuuacaaacacuuugugcuauaaaaaaguaaauuuuuaaaaa
gccacgugugugugugguauauauauauauauauauauauuuaaagccaaggguuuugauacuuuuuuacaaaaac
uacaagagaaaacaaauauaccuguccaaaccauauacuuuuaaaagagcauuuuuuuuuuccauacaagcuguuguu
aauuuggggguaaagugcugauuugcaaacuucaucaaauuguucccaaguggauucuccuuguuugucucccccu
accaaccccaaaguuaccauauuugauguaagaaucaggcauguuagaauguugugucacacuaacugauucugcuc
uuuuugucuugucauucaaguuccguuagcuucuguacgcggugcccuuugcagucuggugucucuuccagaggc
gagggggcugaggauggggugcugcaucucacuagcuauacuggcaucaucuugguaaacugaaaaccaaaugugg
acauuuguaaaaaucagugcacuguuucuagagagagauuaaauucauuuaaaaaaaa

LRP8 isoforma 2 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14)

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcrnerci psvwrcdedd dcldhsdedd
cpkktcadsd ftcdnghcih erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatwlnec lhnnggcshi ctdlkigfec tcpagfqlld qktcgdidec kdpdacsqic
vnykgyfkce cypgyemdll tknckaaagk spsliftnrh evrridlvkr nysrlipmlk nvvaldveva
tnriywcdls yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwvhkh iywtdsgnkt isvatvdggr
rrtlfsrnls epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksgl ngvdrqtlvs dniewpngit ldllsqrlyw vdsklhqlss
idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrlngl eisilaenln nphdivifhe lkqprapdac
elsvqpnggc eylclpapqi sshspkytca cpdtmwlgpd mkrcyrapqs tstttlastm trtvpattra pgttvhrsty
qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lspatsnhsq hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall cmsgyliwrn
wkrkntksmn fdnpvyrktt eeededelhi grtaqighvy paaissfdrp lwaepclget repedpapal
kelfvlpgep rsqlhqlpkn plselpvvks krvalsledd glp

LRP8 isoforma 3 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 15)

gcuggcggcggccgcccagggccggggccgcgcgcccagccugagcccgccccgccgccgagcgucaccgaaccugc
uugaaaugcagccgaggagccggggcgggcggcagcggcggcggcggcggcggcggcgggggcagcggcaaccccggcg
ccgcggcaaggacucggagggcugagacgcggcggcggcggcgcggggagcgcggggcgcggcggccggagccccg
ggcccgccaugggccucccgagccgggcccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcu
gcugcagcuccagcaucuugcggcggcagcggcugauccgcugcucggcggccaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcaucccucuguguggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacgguggaaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuccgaugaguccgaggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcuguggacccaccagccacaaguguguaccugccucguggcgcugcgacgggga
gaaggacugcgaggguggagcggaugaggccggcugugcuaccucacugggcaccugccgugggacgaguuccag
uguggggaugggacaugugcuccuugcaaucaagcacugcaaccaggagcaggacuguccagaugggagugaugaag
cuggcugccuacaggggcugaacgagugucugcacaacaauggcggcugcucacacaucugcacugaccucaagauu
ggcuuugaaugcacgugcccagcaggcuuccagcuccuggaccagaagaccuguggcgacauugaugagugcaagga
cccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuuaagugugagugcuacccuggcuacgagaug

gaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcuggcaagagcccaucccuaaucuucaccaaccggcacgaggugcgg
aggaucgaccuggugaagcggaacuauucacgccucaucccccaugcucaagaaugucguggcacuagauguggaagu
ugccaccaaucgcaucuacuggugugaccucuccuaccguaagaucuauagcgccuacauggacaaggccagugacc
cgaaagagcaggagguccucauugacgagcaguugcacucuccagagggccuggcaguggacuggguccacaagcac
aucuacuggacugacucgggcaauaagaccaucucaguggccacaguugaugguggccgccgacgcacucucuucag
ccguaaccucagugaaccccgggccaucgcuguugacccccugcgaggguucauguauuggucugacuggggggac
caggccaagauugagaaaucugggcucaacgguguggaccggcaaacacuggugucagacaauauugaauggcccaa
cggaaucacccuggaucugcugagccagcgcuuguacuggguagacuccaagcuacaccaacuguccagcauugacu
ucaguggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccugagccacccuuuugggauagcuguguuuga
ggacaagguguucuggacagaccuggagaacgaggccauuuucagugcaaaucggcucaauggccuggaaaucucca
uccuggcugagaaccucaacaacccacaugacauugucaucuuccaugagcugaagcagccaagagcuccagaugccu
gugagcugaguguccagccuaauggaggcugugaauaccugugccuuccugcuccucagaucuccagccacucuccc
aaguacacaugugccuguccugacacaauguggcuggguccagacaugaagaggugcuaccgagaugcaaaugaaga
caguaagaugggcucaacagucacugccgcuguuaucgggaucaucgugcccauaguggugauagcccuccugugc
augaguggauaccugaucuggagaaacuggaagcggaagaacaccaaaagcaugaauuuugacaacccagucuacag
gaaaacaacagaagaagaagacgaagaugagcuccauauagggagaacugcucagauuggccaugucuauccugcac
gaguggcauuaagccuugaagaugauggacuacccugaggaugggaucacccccuucgugccucauggaauucagu
cccaugcacuacacucuggauggguguaugacuggaugaaugggguuucuauauaugggucugugugaguguaugug
ugugugugauuuuuuuuuuuaaauuuauguugcggaaaggguaaccacaaaguuaugaugaacugcaaacauccaaag
gaugugagaguuuuucuauguauaaauguuuuauacacuuuuuaacugguugcacuacccaugaggaauucguggaa
uggcuacugcugacuaacaugaugcacauaaccaaauggggggccaauggcacaguaccuuacucaucauuuaaaaac
uauauuuacagaagauguuuggguugcuggggggggcuuuuuuaggguuuuggggcauuuguuuuuuguaaauaaga
ugauuaugcuuuguggcuauccaucaacauaaguaaaaaaaaaaaaaaaacacuucaacucccucccccauuuagauu
auuuauuaacauauuuuaaaaaucagaugaguucuauaaauaauuuagagaagugagaguauuuauuuuuggcaug
uuuggcccaccacacagacucugugugugguaugugugugguuuauaugugguaugugugugacagaaaaaucuguaga
gaagaggcacaucuauggcuacuguucaaauacauaaagauaaauuuauuuucacacaguccacaaggggguauaucu
uguaguuuucagaaaagccuuuggaaaucuggaucagaaaauagauaccaugguuugugcaauuauguaguaaaaa
aggcaaaucuuuucaccucuggcuauuccugagaccccaggaagucaggaaaagccuuucagcucacccauggcugc
ugugacuccuaccagggcuuucuuggcuuuggcgaaggucaguguacagacauuccaugguaccagagugcucaga
aacucaagauaggauaugccucacccucagcuacuccuuguuuuaaaguucagcucuuugaguaacuucuucaauuu
cuuucaggacacuuggguugaauucaguaaguuuccucugaagcacccugaagggugccauccuuacagagcuaag
uggagacguuuccagaucagcccaaguuuacuauagagacuggcccaggcacugaaugucuaggacaugcugugga
ugaagauaaagauggguggaauagguuuuaucacaucucuuauuucucuuuucccccuuacucucuaccauuuccuuu
augugggaaacauuuuaagguaauaaaauagguuacuuaccaucauauguucauauagaugaaacuaauuuuuggc
uuaagucagaacaacuggccaaaauugaagucauauuugaggggggaaauggcauacgcaauauuauauuauauug
gauauuuauguucacacaggaauuuggguuuacugcuuuguaaauaaaaggaaaaacuccgggguauauguauagaug
uucuucauuauagacaucuucuuugcuuuucuuggccuuggggggaggaagggagaagugcucuuuucuacuugug
gggucucccauuggaaacauaauccuauagucccagaaggauucagucccaguggcuuucccauccaaagagaaag
aguuugaguuucuuaacucugcuguucugccacuuacucccacuagacaaccagggacaaggugcaacauggaagug
uuugacuuaaguaggagcagaggagcugcaucuaaucucaucauaccuggaacuugacacacuuaagcaaaugccuu
cccaucccuaccugccagaugccccaacucaaugaaguuggaugucucaccagcuugauacccuuugaauuuucag
ucagacauucuggaguucuagcauccuguaccuaggaccuuccucugugucacucuuggccuccuaaacucuaagaa
aauaacuauauucuggagcuugggcaguguguuuugcauaauccagcaaucuccucaugacaugcauguguugaua
guccugaaacauucauugagagggguaaaugcaguugaccuagaaugaccaauaccaaacagaauuuuaagaacaggu
ggccaacuccuauggagcuuacucacauauuacuauucuuuuaagaacggaaaguaaaauuauuuuugacugaagaa
aaaugaugacagugaaaaacauggaaauguacucaaaacaagugacuuuuucuguaaccuuccaaagaaacugaauu
uuccaaggaauuaaaugauaacaguggcuaaggcauaguuucuaaacuuucaguaagauccuggcauucacagaaaa

aaaugaugaaugggucuggacauacagccugagaucucaaaaugacaaugaaaauucacaacuuuuucucagagaca
uucauguuuccugcauaugcuacaacugcaguuugaaagaggcagcaaugggagcaacccuuuacaagaaacaaauu
gugauauauucauguguuggacggcaguaaaauaagaugaaaccugaggagucagauccaccuucccccauucauaga
ggcuuuucagccucauuuugagguacaguuacauaucuuuugccuuuugccccgugcauagcuaucuacagccaa
ucacagaucacagagucacuggacuauagagcuggaaggaagcucagagacaaugccaaggggcagaaaauuuauc
agaagccaguccagugcguuuccuccauuuccuucugcaggaagacuauuuugggcugccugaacauuguaucaaa
ccugcuaccuauacuauggucuaccuuuccuccaguggaauuacaaaggcacuaacugaaaugccuucuagaaacag
agaaaacgaaacuguacuuauuuacucuugauacacagauuauuuauaaaacagauugaaguaaccuguuaacuggc
aaaaagagaaugagaucggauuuaaauguauggcaguaaguccuauugaucccuccaguuaucucaguaugacugca
guauauucauucacuaaaaccacucacuagauaccaacuacacaccuggcacugcagauguaaaggucagucacacau
guucugacuuuacagaguucacaguagcaguggaggaugauauauguggaaacaaaaaaggcauugauucuauuca
gagcacuguuagggcucaaaggagagaggggucuuuccaccuaagaaaugaggaauagggucaucauagaagugacc
uuaagucuuaaaaauuaagaaggggauuccaagcugcuucagacagagacacaucgagcuaaaacacagagguauga
aagagcacagggacuuuaggaauugcacaguucauucuaacaggaacaaaaggcucaaggggggcaagaaaugaggc
uguauggaaagagauucaauguaagcacuuuauaaaauagauuaauuucugauucaaugaagcauuucuugaucau
uguguacaaggcacuacaugcaucauggaaaauucauuaggaugcauugccagcacuuugcagaacugauauuauuc
agccucaagcuuuccaguggccaaagggaaaugcugacugcuuuucauauauuugagucaaagauuuuuuauauggg
ucaaugaagacuaauauaagggcaguggguauuuucacagaugcaugccauguugucgagagccucuuagauuuucu
caacugugagaaagaaaaacgaaaauguugaagacguugagucuggagaggggauacuaaucacuguccaguuggge
acuggugggaaugggggaaauggcacaggaaugcaagccucuccacccuaccccccgaacuccagccauacacucaucg
uuucacaaaauauaaaaugaguuagcauuaaauguuucagaguaaauauauuccuuuucccgaaaugcaugaagauaga
guaacagacuucucacacuguauuuuuagggguauggagaauuuagaaggguuaaagaauuacugcuucaauuuuuca
guuaaaaaaaaaaucaggaagcucuguucauucaggcuaugcaccaugugcacagucaagaauuagcagaaacccucu
gcauuuacaaacacuuugugcuauaaaaaaguaauuuuuaaaaagccacgugugugugugugguauauauauauaua
uauauauauuuaaagccaaggguuugauacuuuuuuacaaaaacuacaagagaaaacaaauauaccuguccaaaccau
auacuuuuaaaagagcauuuuuuuuuccauacaagcuguuguuaauuuggggguaaagugcugauuugcaaacuuc
aucaaauuguucccaaguggauucuccuuguuugucucccccuaccaaccccaaaguuaccauauuugauguaagaa
ucaggcauguuagaauguugugucacacuaacugauucugcucuuuuugucuugucauucaaguuccguuagcuuc
uguacgcggugcccuuugcagucuggugucucuuccagaggcgaggggggcugaggaugggggugcugcaucucacu
agcuauacuggcaucaucuugguaaacugaaaaccaaauguggacauuuguaaaaaucagugcacuguuucuagagag
agauuaaaauucauuuaaaaaaaa

LRP8 isoforma 3 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16)

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcrnerci psvwrcdedd dcldhsdedd
cpkktcadsd ftcdnghcih erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatslgtc rgdefqcgdg tcvlaikhcn qeqdcpdgsd eagclqglne clhnnggcsh
ictdlkigfe ctcpagfqll dqktcgdide ckdpdacsqi cvnykgyfkc ecypgyemdl ltknckaaag kspsliftnr
hevrridlvk rnysrlipml knvvaldvev atnriywcdl syrkiysaym dkasdpkeqe vlideqlhsp
eglavdwvhk hiywtdsgnk tisvatvdgg rrrtlfsrnl sepraiavdp lrgfmywsdw gdqakieksg
lngvdrqtlv sdniewpngi tldllsqrly wvdsklhqls sidfsggnrk tlisstdfls hpfgiavfed kvfwtdlene
aifsanrlng leisilaenl nnphdivifh elkqprapda celsvqpngg ceylclpapq isshspkytc acpdtmwlgp
dmkrcyrdan edskmgstvt aavigiivpi vviallcmsg yliwrnwkrk ntksmnfdnp vyrktteeed
edelhigrta qighvyparv alsleddglp

LRP8 isoforma 4 - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 17)

gcuggcggcggccgcccagggccggggccgcgcgcccagccugagcccgccccgccgccgagcgucaccgaaccugc
uugaaaugcagccgaggagccgggggcgggcggcagcggcggcggcggcggcgggggcagcggcaaccccggcg

ccgcggcaaggacucggagggcugagacgcggcggcggcggcgcggggagcgcggggcgcggcggccggagccccg
ggcccgccaugggccucccgagccgggcccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcu
gcugcagcuccagcaucuugcggcggcagcggcugauccgcugcucggcggccaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcaucccucuguguggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacgguggaaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuccgaugaguccgaggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcuguggacccaccagccacaaguguguaccugccucguggcgcugcgacgggga
gaaggacugcgaggguggagcggaugaggccggcugugcuaccuugugcgccccgcacgaguuccagugcggcaac
cgcucgugccuggccgccguguucgugugcgacggcgacgacgacuguggugacggcagcgaugagcgcggcugug
cagacccggccugcgggccccgcgaguuccgcugcggcggcgauggcggcggcgccugcaucccggagcgcugggu
cugcgaccgccaguuugacugcgaggaccgcucggacgaggcagccgagcucugcggccguccgggccccggggcca
cguccgcgcccgccgccugcgccaccgccucccaguucgccugccgcagcggcgagugcgugcaccugggcuggcgc
ugcgacggcgaccgcgacugcaaagacaaaucggacgaggccgacugcccacugggcaccugccgugggacgaguu
ccaguguggggaugggacaugugcccuugcaaucaagcacugcaaccaggagcaggacuguccagaugggagugau
gaagcuggcugccuacaggggcugaacgagugcucugcacaacaauggcggcugcucacacaucugcacugaccucaa
gauuggcuuugaaugcacgugcccagcaggcuuccagcuccuggaccagaagaccuguggcgacauugaugagugc
aaggacccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuuaagugugagugcuacccuggcuacga
gauggaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcuggcaagagcccaucccuaaucuucaccaaccggcacgaggu
gcggaggaucgaccuggugaagcggaacuauucacgccucaucccccaugcucaagaaugucguggcacuagaugugg
aaguugccaccaaucgcaucuacuggugugaccucuccuaccguaagaucuauagcgccuacauggacaaggccagu
gacccgaaagagcaggaggcuccucauugacgagcaguugcacucuccagagggccuggcaguggacuggguccacaa
gcacaucuacuggacugacucgggcaauaagaccaucucaguggccacaguugaugguggccgccgacgcacucucu
ucagccguaaccucagugaaccccgggccaucgcuguugacccccugcgaggguucauguauuggucugacuggggg
ggaccaggccaagauugagaaaucugggcucaacgguguggaccggcaaacacuggugucagacaauauugaauggc
ccaacggaaucacccuggaucugcugagccagcgcuuguacuggguagacuccaagcuacaccaacuguccagcauu
gacuucaguggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccugagccacccuuuugggauagcuguguu
ugaggacaagguguucuggacagaccuggagaacgaggccauuuucagugcaaaucggcucaauggccuggaaauc
uccauccuggcugagaaccucaacaacccacaugacauugucaucuuccaugagcugaagcagccaagagcuccagau
gccugugagcugaguguccagccuaauggaggcugugaauaccugugccuuccugcuccucagaucuccagccacuc
ucccaaguacacaugugccuguccugacacaauguggcuggguccagacaugaagaggugcuaccgagcaccucaau
cuaccucaacuacgacguuagcuucuaccaugacgaggacaguaccugccaccacaagagccccgggaccaccgucc
acagauccaccuaccagaaccacagcacagagacaccaagccugacagcugcagucccaagcucaguuaguguccca
gggcucccagcaucagcccgucuacccuaagcccugcaaccagcaaccacucccagcacuaugcaaaugaagacagua
agaugggcucaacagucacugccgcuguuaucgggaucaucgugcccauaguggugauagcccuccugugcaugag
uggauaccugaucuggagaaacuggaagcggaagaacaccaaaagcaugaauuuugacaacccagucuacaggaaaac
aacagaagaagaagacgaagaugagcuccauauagggagaacugcucagauuggccaugucuauccugcacgagugg
cauuaagccuugaagaugauggacuacccugaggaugggaucacccccuucgugccucauggaauucagucccaugc
acuacacucuggauggguguaugacuggaugaaugggguuucuauauaugggucugugugaguguaugugugugugu
gauuuuuuuuuuuaaauuuauguugcggaaagguaaccacaaaguuaugaugaacugcaaacauccaaaggauguga
gaguuuuucuauguauaaauguuuuauacacuuuuuaacugguugcacuacccaugaggaauucguggaauggcuac
ugcugacuaacaugaugcacauaaccaaaugggggccaauggcacaguaccuuacucaucauuuaaaaacuauauuu
acagaagauguuugguugcuggggggggcuuuuuuagguuuuggggcauuuguuuuuuguaaauaagaugauuau
gcuuuguggcuauccaucaacauaaguaaaaaaaaaaaaaaaacacuucaacucccucccccauuuagauuauuuauu
aacauauuuuaaaaaucagaugaguucuauaaauaauuuagagaagugagaguauuuauuuuuggcauguuuggcc
caccacacagacucugugugguauguguguguuuauauguguauguguguguacagaaaaaucuguagagaagagg
cacaucuauggcuacuguucaaauacauaaagauaaaauuuauuuucacacaguccacaaggguauaucuuguaguu
uucagaaaagccuuuggaaaucuggaucagaaaauagauaccaugguuugugcaauuauguaguaaaaaaggcaaau

cuuuucaccucuggcuauuccugagaccccaggaagucaggaaaagccuuucagcucacccauggcugcugugacuc
cuaccagggcuuucuuggcuuuggcgaaggucaguguacagacauuccaugguaccagagugcucagaaacucaaga
uaggauaugccucacccucagcuacuccuuguuuuaaaguucagcucuuugaguaacuucuucaauuucuuucagg
acacuuggguugaauucaguaaguuuccucugaagcacccugaagggugccauccuuacagagcuaaguggagacg
uuuccagaucagcccaaguuuacuauagagacuggcccaggcacugaaugucuaggacaugcuguggaugaagauaa
agaugguggaauagguuuuaucacaucucuuauuucucuuuucccccuuacucucuaccauuuccuuuauguggggga
aacauuuuaagguaauaaauagguuacuuaccaucauauguucauauagaugaaacuaauuuuuggcuuaagucaga
acaacuggccaaaauugaagucauauuugaggggggaaauggcauacgcaauauuauauuauauuggauauuuaug
uucacacaggaauuuggguuuacugcuuuguaaauaaaaggaaaaacuccggguauauguauagauguucuucauua
uagacaucuucuuugcuuuucuuggccuuggggggaggaagggagaagugcucuuuucuacuuguggggucuccca
uuggaaacauaauccuauagucccagaaggauucaguccccaguggcuuucccauccaaagagaaagaguuugaguu
ucuuaacucugcuguucugccacuuacucccacuagacaaccagggacaaggugcaacauggaaguguuugacuuaa
guaggagcagaggagcugcaucuaaucucaucauaccuggaacuugacacacuuaagcaaaugccuucccaucccuac
cugccagaugccccccaacucaaugaaguuggaugucucaccagcuugauacccuuugaauuuucagucagacauucu
ggaguucuagcauccuguaccuaggaccuuccucugugucacucuuggccuccuaaacucuaagaaaauaacuauau
ucuggagcuuggggcaguguguuuugcauaauccagcaaucuccucaugacaugcauguguugauaguccugaaaca
uucauugagaggguaaaugcaguugaccuagaaugaccaauaccaaacagaauuuuaagaacagguggccaacuccu
auggagcuuacucacauauuacuauucuuuuaagaacggaaaguaaaauuauuuuugacugaagaaaaaugaugaca
gugaaaaacauggaaauguacucaaaacaagugacuuuuucuguaaccuuccaaagaaacugaauuuuccaaggaau
uaaaugauaacaguggcuaaggcauaguuucuaaacuuucaguaagauccuggcauucacagaaaaaaaugaugaau
ggggucuggacauacagccugagaucucaaaaugacaaugaaauucacaacuuuuucucagagacauucauguuucc
ugcauaugcuacaacugcaguuugaaagaggcagcaaugggagcaacccuuuacaagaaacaaauugugauauauuc
auguguuggacggcaguaaaauaagaugaaaccugaggagucagauccaccuucccccauucauagaggcuuuucagc
cucauuuugagguacaguuacauaucuuuugccuuuugccccgugcauagcuaucuacagccaaucacagaucaca
gagucacuggacuauagagcuggaaggaagcucagagacaaugccaaggggcagaaaauuuaucagaagccagucc
cagugcguuuccuccauuuccuucugcaggaagacuauuuugggcugccugaacauuguaucaaaccugcuaccua
uacuauggucuaccuuuccuccaguggaauuacaaaggcacuaacugaaaugccuucuagaaacagagaaaacgaaac
uguacuuauuuacucuugauacacagauuauuuauaaaacagauugaaguaaccuguuaacuggcaaaaagagaaug
agaucggauuuaaauguauggcaguaaguccuauugaucccuccaguuaucucaguaugacugcaguauauucauu
cacuaaaaccacucacuagauaccaacuacacaccuggcacugcagauguaaaggucagucacacauguucugacuuu
acagaguucacaguagcaguggaggaugauauauguggaaacaaaaaaggcauugauucuauucagagcacuguuag
ggcucaaaggagagaggggucuuuccaccuaagaaaugaggaauagggucaucauagaagugaccuuaaagucuuaaa
aauuaagaaggggauuccaagcugcuucagacagagacacaucgagcuaaaacacagagguaugaaagagcacagggа
cuuuaggaauugcacaguucauucuaacaggaacaaaaggcucaaggggggcaagaaaugaggcuguauggaaagag
auucaauguaagcacuuuauaaaauagauuaauuucugauucaaugaagcauuucuugaucauuguguacaaggcac
uacaugcaucauggaaaauucauuaggaugcauugccagcacuuugcagaacugauauuauucagccucaagcuuuc
caguggccaaagggaaaugcugacugcuuuucauauauuugagucaaagauuuuuuauauggucaaugaagacuaa
uauaagggcaguggguauuuucacagaugcaugccauguugucgagagccucuuagauuuucucaacugugagaaag
aaaaacgaaaauguugaagacguugagucuggagaggggauacuaaucacuguccaguuggggcacuggugggaaug
gggaaauggcacaggaaugcaagccucuccacccuacccccgaacuccagccauacacucaucguuucacaaaauau
aaaugaguuagcauuaaauguuucagaguaaauaauuccuuuucccgaaaugcaugaagauagaguaacagacuucu
cacacuguauuuuuaggguauggagaauuuagaaggguuaaagaauuacugcuucaauuuuucaguuaaaaaaaaau
caggaagcucuguucauucaggcuaugcaccaugugcacagucaagaauuagcagaaacccucugcauuuacaaacac
uuugugcuauaaaaaaguaauuuuuaaaaagccacgugugugugugguauauauauauauauauauauuuuaaa
gccaagguuuugauacuuuuuuacaaaaacuacaagagaaaacaaauauaccuguccaaaccauauacuuuuaaaaga
gcauuuuuuuuuccauacaagcuguuguuaauuuggggguaaagugcugauuugcaaacuucaucaaauuguuccc
aaguggauucuccuuguuugucucccccuaccaaccccaaaguuaccauauuugauguaagaaucaggcauguuaga

auguugugucacacuaacugauucugcucuuuuugucuugucauucaaguuccguuagcuucuguacgcggugccc
uuugcagucuggugucucuuccagaggcgagggggcugaggaugggggugcugcaucucacuagcuauacuggcauc
aucuugguaaacugaaaaccaaauguggacauuuguaaaaaucagugcacuguuucuagagagagauuaaaauucauuu
aaaaaaaa

LRP8 isoforma 4 - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18)

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcrnerci psvwrcdedd dcldhsdedd
cpkktcadsd ftcdnghcih erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatlcaph efqcgnrscl aavfvcdgdd dcgdgsderg cadpacgpre frcggdggga
ciperwvcdr qfdcedrsde aaelcgrpgp gatsapaaca tasqfacrsg ecvhlgwrcd gdrdckdksd
eadcplgtcr gdefqcgdgt cvlaikhcnq eqdcpdgsde agclqglnec lhnnggcshi ctdlkigfec tcpagfqlld
qktcgdidec kdpdacsqic vnykgyfkce cypgyemdll tknckaaagk spsliftnrh evrridlvkr
nysrlipmlk nvvaldveva tnriywcdls yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwvhkh
iywtdsgnkt isvatvdggr rrtlfsrnls epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksgl ngvdrqtlvs
dniewpngit ldllsqrlyw vdsklhqlss idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrlngl
eisilaenln nphdvifhe lkqprapdac elsvqpnggc eylclpapqi sshspkytca cpdtmwlgpd
mkrcyrapqs tstttlastm trtvpattra pgttvhrsty qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lspatsnhsq
hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall cmsgyliwrn wkrkntksmn fdnpvyrktt eeededelhi
grtaqighvy parvalsled dglp

CTGF - Secuencia de ARN (SEQ ID NO: 19)

aaacucacacaacaacucuuccccgcugagaggagacagccagugcgacuccacccuccagcucgacggcagccgccc
cggccgacagccccgagacgacagcccggcgcgucccgguccccaccuccgaccaccgccagcgcuccaggccccgcc
gcucccgcucgccgccaccgcgcccuccgcuccgcccgcagugccaaccaugaccgccgccaguaugggccccgucc
gcgucgccuucgugguccuccucgcccucugcagccggccggccgucggccagaacugcagcgggccgugccggug
cccggacgagccggcgccgcgcugcccggcgggcgugagccucgugcuggacggcugcggcugcugccgcgucugc
gccaagcagcugggcgagcugugcaccgagcgcgacccccugcgacccgcacaagggccucuucugugacuucggcuc
cccggccaaccgcaagaucggcgugugcaccgccaaagauggugcucccugcaucuucggugguacgguguaccgca
gcggagaguccuuccagagcagcugcaaguaccagugcacgugccuggacggggcgguggggcugcaugccccugug
cagcauggacguucgucugcccagcccugacugccccuucccgaggagggucaagcugcccgggaaaugcugcgagg
agugggugugugacgagcccaaggaccaaaccgugguuggggccugcccucgcggcuuaccgacuggaagacacguu
uggcccagacccaacuaugauuagagccaacugccugguccagaccacagaguggagcgccuguuccaagaccugug
ggaugggcaucuccacccgggguuaccaaugacaacgccuccugcaggcuagagaagcagagccgccugugcaugguc
aggccuugcgaagcugaccuggaagagaacauuaagaagggcaaaaagugcauccguacucccaaaaucuccaagccu
aucaaguuugagcuuucuggcugcaccagcaugaagacauaccgagcuaaaauucuguggaguauguaccgacggccg
augcugcacccccacagaaccaccacccugccgguggaguucaagugcccugacggcgaggucaugaagaagaacau
gauguucaucaagaccugugccugccauuacaacugucccggagacaaugacaucuuugaaucgcuguacuacagga
agauguacggagacauggcaugaagccagagagugagagacauuaacucauuagacuggaacuugaacugauucaca
ucucauuuuuccguaaaaaugauuucaguagcacaaguuauuuaaaucuguuuuucuaacuggggggaaaagauucc
cacccaauucaaaacauugugccaugucaaacaaauagucuaucaaccccagacacugguuugaagaauguuaagacu
ugacaguggaacuacauuaguacacagcaccagaauguauauuaaggugugggcuuuaggagcaguggggaggguacc
agcagaaaggguuaguaucaucagauagcaucuuauacgaguaauaugccugcuauuugaaguguaauugagaagga
aaauuuuagcgugcucacugaccugccuguagccccagugacagcuaggaugugcauucuccagccaucaagagacu
gagucaaguuguuccuuaagucagaacagcagacucagcucugacauucugauucgaaugacacuguucaggaaucg
gaauccugucgauuagacuggacagcuuguggcaagugaauuugccuguaacaagccagauuuuuuaaaaauuuaua
uuguaaaauauugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugugu
uugugccuuuuuauuuuuguuuuuaaugcuuugauauuucaauguuagccucaauuucugaacaccauagguagaa

uguaaagcuugucugaucguucaaagcaugaaauggauacuuauauggaaauucugcucagauagaaugacagucc
gucaaaacagauuguuugcaaaggggaggcaucaguguccuuggcaggcugauuucuagguaggaaauguggguagc
cucacuuuuaaugaacaaauggccuuuauuaaaaacugagugacucuauauagcugaucaguuuuuucaccuggaag
cauuuguuucuacuuugauaugacuguuuuucggacaguuuauuuguugagagugugaccaaaaguuacauguuu
gcaccuuucuaguugaaaauaaaguguauauuuuuucuauaaaaaaaaaaaaaaaaaa

CTGF - Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20)

mtaasmgpvr vafvvllalc srpavgqncs gpcrcpdepa prcpagvslv ldgcgccrvc akqlgelcte
rdpcdphkgl fcdfgspanr kigvctakdg apcifggtvy rsgesfqssc kyqctcldga vgcmplcsmd
vrlpspdcpf prrvklpgkc ceewvcdepk dqtvvgpala ayrledtfgp dptmirancl vqttewsacs
ktcgmgistr vtndnascrl ekqsrlcmvr pceadleeni kkgkkcirtp kiskpikfel sgctsmktyr akfcgvctdg
rcctphrttt lpvefkcpdg evmkknmmfi ktcachyncp gdndifesly yrkmygdma

LXR-a isoforma 1: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 21)

aggaaggagggguggccugaccccucggcaguccccucccucagccuuuccccaaaauugcuacuucucuggggcucc
agguccugcuugugcucagcuccagcucacuggcuggccaccgagacuucuggacaggaaacugcaccauccucuuc
ucccagcaaggggcuccagagacugcccacccaggaagucugguggccuggggauuuggacagugccuugguaau
gaccagggcuccaggaagagauguccuuguggcuggggggccccugugccugacauuccuccugacucugcggugga
gcuguggaagccaggcgcacaggaugcaagcagccaggcccagggaggcagcagcugcauccucagagaggaagcca
ggaugccccacucugcuggggguacugcaggggugggggcuggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggc
agagccccccuucagaacccacagagauccguccacaaaagcggaaaaaggggccagccccccaaaaugcuggggaacga
gcuaugcagcgugugugggggacaaggccucgggcuuccacuacaauguucugagcugcgagggcugcaagggauuc
uuccgccgcagcgucaucaagggagcgcacuacaucugccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcg
ucgcaagugccaggagugucggcuucgcaaaugccgucaggcuggcaugcgggaggagugugcuccugucagaagaa
cagauccgccugaagaaacugaagcggcaagaggaggaacaggcucaugccacauccuugccccccagggcuuccuca
ccccccccaaauccugccccagcucagcccggaacaacugggcaugaucgagaagcucgucgcugcccagcaacagugu
aaccggcgcuccuuuucugaccggcuucgagucacgccuuggcccauggcaccagaucccccauagccgggaggcccg
ucagcagcgcuuugcccacuucacugagcuggccaucgucucugugcaggagauaguugacuuugcuaaacagcuac
ccggcuuccugcagcucagccgggaggaccagauugcccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucugga
gacaucucggagguacaacccugggagugagaguaucaccuuccucaaggauuucaguuauaaaccgggaagacuuug
ccaaagcagggcugcaaguggaauucaucaaccccaucuucgaguucuccagggccaugaaugagcugcaacucaau
gaugccgaguuugccuugcucauugcuaucagcaucuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccaggu
agagaggcugcagcacacauauguggaagcccugcaugccuacgucuccauccaccaucccccaugaccgacugaugu
ucccacggaugcuaaugaaacuggugagccuccggacccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcgu
cugcaggacaaaaagcucccaccgcugcucucugagaucugggaugugcacgaaugacuguucugucccccauauuuu
cuguuuucuuggccggauggcugaggccuggugggcugccuccuagaaguggaacagacugagaagggcaaacauuc
cugggagcugggcaaggagauccucccguggcauuaaaagagagucaaaggguugcgaguuuuguggcuacugagc
aguggagcccucgcuaacacugugcuguucugaagaucaugcugaccccacaaacggaugggccuggggccacuu
ugcacaggguucuccagagcccugcccauccugccuccaccacuuccuguuuuucccacagggccccaagaaaaauuc
uccacugucaaaaaaaaa

LXR-a (NR1H3) isoforma 1: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22)

mslwlgapvp dippdsavel wkpgaqdass qaqggsscil reearmphsa ggtagvglea aeptalltra
eppsepteir pqkrkkgpap kmlgnelcsv cgdkasgfhy nvlscegckg ffrrsvikga hyichsgghc
pmdtymrrkc qecrlrkcrq agmreecvls eeqirlkklk rqeeeqahat slpprasspp qilpqlspeq
lgmieklvaa qqqcnrrsfs drlrvtpwpm apdphsrear qqrfahftel aivsvqeivd fakqlpgflq lsredqiall
ktsaievmll etsrrynpgs esitflkdfs ynredfakag lqvefinpif efsramnelq lndaefalli aisifsadrp
nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvslrtlssv hseqvfalrl qdkklpplls eiwdvhe

LXR-a (NR1H3) isoforma 2: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 23)

aggaaggagggguggccugaccccucggcagucccucccccucagccuuuccccaaaauugcuacuucucuggggcucc
agguccugcuugugcucagcuccagcucacuggcuggccaccgagacuucuggacaggaaacugcaccauccucuuc
ucccagcaaggggcuccagagacugcccacccaggaagucugguggccuggggauuuggacagugccuugguaau
gaccagggcuccaggaagagauguccuuguggcuggggggccccugugccugacauuccuccugacucugcggugga
gcuguggaagccaggcgcacaggaugcaagcagccaggcccagggaggcagcagcugcauccucagagaggaagcca
ggaugccccacucugcuggggguacugcaggggugggcuggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggc
agagccccccuucagaacccacagagauccguccacaaaagcggaaaaaggggccagccccccaaaaugcuggggaacga
gcuaugcagcgugugugggacaaggccucgggcuuccacuacaauguucugagcugcgagggcugcaagggauuc
uuccgccgcagcgucaucaagggagcgcacuacaucugccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcg
ucgcaagugccaggagugucggcuucgcaaaugccgucaggcuggcaugcgggaggagugugucccugucagaagaa
cagauccgccugaagaaacugaagcggcaagaggaggaacaggcucaugccacauccuugccccccagggcuuccuca
ccccccccaaauccugccccagcucagcccggaacaacugggcaugaucgagaagcucgucgcugcccagcaacagugu
aaccggcgcuccuuuucugaccggcuucgagucacggugaugcuucuggagacaucucggagguacaacccuggga
gugagaguaucaccuuccucaaggauuucaguuauaaccgggaagacuuugccaaagcagggcugcaaguggaauuc
aucaaccccaucuucgaguucuccagggccaugaaugagcugcaacucaaugaugccgaguuugccuugcucauugc
uaucagcaucuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauaugugg
aagcccugcaugccuacgucuccauccaccaucccccaugaccgacugauguucccacggaugcuaaugaaacugguga
gccuccggacccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcgucugcaggacaaaaagcucccaccgcug
cucucugagaucugggaugugcacgaaugacuguucugucccccauauuuucuguuuucuuggccggauggcugag
gccugguggcugccuccuagaaguggaacagacugagaagggcaaacauuccuggggagcugggcaaggagauccucc
cguggcauuaaaagagagucaaaggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagcccucgcuaacacugugcu
gugucugaagaucaugcugaccccacaaacggaugggccuggggccacuuugcacaggguucuccagagcccugcc
cauccugccuccaccacuuccuguuuuucccacagggccccaagaaaaauucuccacugucaaaaaaaaa

LXR-a (NR1H3) isoforma 2: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24)

mslwlgapvp dippdsavel wkpgaqdass qaqggsscil reearmphsa ggtagvglea aeptalltra
eppsepteir pqkrkkgpap kmlgnelcsv cgdkasgfhy nvlscegckg ffrrsvikga hyichsgghc
pmdtymrrkc qecrlrkcrq agmreecvls eeqirlkklk rqeeeqahat slpprasspp qilpqlspeq
lgmieklvaa qqqcnrrsfs drlrvtvmll etsrrynpgs esitflkdfs ynredfakag lqvefinpif efsramnelq
lndaefalli aisifsadrp nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvslrtlssv hseqvfalrl
qdkklpplls eiwdvhe

LXR-a (NR1H3) isoforma 3: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 25)

aucuuacuuagggaccugcuggggugcggggaaaaggcgcagucucgguggggauugcgugcaggagggucguggu
cuggcuguggcggaggagcauaagaagacucugcgguggagcuguggaagccaggcgcacaggaugcaagcagcca
ggcccagggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggaugccccacucugcuggggguacugcaggggug
gggcuggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggcagagcccccuucagaacccacagagauccguccacaa
aagcggaaaaaggggccagcccccaaaaugcuggggaacgagcuaugcagcgugugugggacaaggccucgggcuu
ccacuacaauguucugagcugcgagggcugcaagggauucuuccgccgcagcgucaucaagggagcgcacuacaucu
gccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcgucgcaagugccaggagugucggcuucgcaaaugccgu
caggcuggcaugcgggaggagugugucccugucagaagaacagauccgccugaagaaacugaagcggcaagaggagga
acaggcucaugccacauccuugccccccagggcuuccucacccccccaaauccugccccagcucagcccggaacaacu
gggcaugaucgagaagcucgucgcugcccagcaacaguguaaccggcgcuccuuuucugaccggcuucgagucacgc
cuuggcccauggcaccagaucccccauagccgggaggcccgucagcagcgcuuugcccacuucacugagcuggccauc

gucucugugcaggagauaguugacuuugcuaaacagcuacccggcuuccugcagcucagccgggaggaccagauug
cccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacaucucggagguacaacccugggagugagaguau
caccuuccucaaggauuucaguuauaaccgggaagacuuugccaaagcagggcugcaaguggaauucaucaacccca
ucuucgaguucuccagggccaugaaugagcugcaacucaaugaugccgaguuugccuugcucauugcuaucagcau
cuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauauguggaagcccugc
augccuacgucuccauccaccaucccccaugaccgacugauguucccacggaugcuaaugaaacuggugagccuccgg
acccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcgucugcaggacaaaaagcucccaccgcugcucucuga
gaucugggaugugcacgaaugacuguucugucccccauauuuucuguuuucuuggccggauggcugaggccuggug
gcugccuccuagaaguggaacagacugagaagggcaaacauuccugggagcuggggcaaggagauccucccguggcau
uaaaagagagucaaaggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagcccucgcuaacacugugcugugucuga
agaucaugcugaccccacaaacggaugggccuggggggccacuuugcacaggguucuccagagcccugcccauccugc
cuccaccacuuccuguuuuucccacagggccccaagaaaaauucuccacugucaaaaaaaaa

LXR-a (NR1H3) isoforma 3: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26)

mphsaggtag vgleaaepta lltraeppse pteirpqkrk kgpapkmlgn elcsvcgdka sgfhynvlsc
egckgffrrs vikgahyich sgghcpmdty mrrkcqecrl rkcrqagmre ecvlseeqir lkklkrqeee
qahatslppr assppqilpq lspeqlgmie klvaaqqqcn rrsfsdrlrv tpwpmapdph srearqqrfa hftelaivsv
qeivdfakql pgflqlsred qiallktsai evmlletsrr ynpgsesitf lkdfsynred fakaglqvef inpifefsra
mnelqlndae falliaisif sadrpnvqdq lqverlqhty vealhayvsi hhphdrlmfp rmlmklvslr tlssvhseqv
falrlqdkkl ppllseiwdv he

LXR-a (NR1H3) isoforma 4: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 27)

gauucuaacuuagcuaagcaaugcuacuggagaccauaggcaaagccaagguacagcuucagggaagucuuugguga
gcccaucucucauuaccaagguaacgaagcgcagacuccgggcccgggugggcggcaucaccaccagguucacgccg
agaaggagcuggaggagagccgcccggcuccagccggaccgcuugcccgccaucaccguuguaaucuaugcagcaaa
caagcuggaacccgcuggguggcaccugcaagcagccgcccggacgcacccacucugcgguggagcuguggaagcca
ggcgcacaggaugcaagcagccaggcccagggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggaugccccacuc
ugcuggggguacugcaggggugggggcuggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggcagagccccccuuca
gaacccacagagauccguccacaaaagcggaaaaaggggccagcccccaaaaugcuggggaacgagcuaugcagcgug
uguggggacaaggccucgggcuuccacuacaauguucugagcugcgagggcugcaagggauucuuccgccgcagcg
ucaucaagggagcgcacuacaucugccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcgucgcaagugccag
gagugucggcuucgcaaaugccgucaggcuggcaugcgggaggagugugguccugucagaagaacagauccgccuga
agaaacugaagcggcaagaggaggaacaggcucaugccacauccuugccccccagggcuuccucacccccccaaaucc
ugccccagcucagcccggaacaacugggcaugaucgagaagcucgucgcugcccagcaacaguguaaccggcgcucc
uuuucugaccggcuucgagucacgccuuggcccauggcaccagaucccccauagccgggaggcccgucagcagcgcuu
ugcccacuucacugagcuggccaucgucucugugcaggagauaguugacuuugcuaaacagcuacccggcuuccugc
agcucagccgggaggaccagauugcccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacaucucggag
guacaacccugggagugagaguaucaccuuccucaaggauuucaguuauaaaccgggaagacuuugccaaagcagggc
ugcaaguggaauucaucaaccccaucuucgaguucuccagggccaugaaugagcugcaacucaaugaugccgaguuu
gccuugcucauugcuaucagcaucuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugca
gcacacauauguggaagcccugcaugccuacgucuccauccaccaucccccaugaccgacugauguucccacggaugcu
aaugaaacuggugagccuccggacccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcgucugcaggacaaaa
agcucccaccgcugcucucugagaucugggaugugcacgaaugacuguucugucccccauauuuucuguuuucuugg
ccggauggcugaggccugguggcugccuccuagaaguggaacagacugagaagggcaaacauuccugggagcuggg
caaggagauccucccguggcauuaaaagagagucaaaggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagcccuc
gcuaacacugugcugugucugaagaucaugcugaccccacaaacggaugggccuggggggccacuuugcacaggguu
cuccagagcccugcccauccugccuccaccacuuccuguuuuucccacagggccccaagaaaaauucuccacugucaa
aaaaaaa

LXR-a (NR1H3) isoforma 4: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 28)

mqqtswnplg gtckqppgrt hsavelwkpg aqdassqaqg gsscilreea rmphsaggta gvgleaaept
alltraepps epteirpqkr kkgpapkmlg nelcsvcgdk asgfhynvls cegckgffrr svikgahyic
hsgghcpmdt ymrrkcqecr lrkcrqagmr eecvlseeqi rlkklkrqee eqahatslpp rassppqilp
qlspeqlgmi eklvaaqqqc nrrsfsdrlr vtpwpmapdp hsrearqqrf ahftelaivs vqeivdfakq lpgflqlsre
dqiallktsa ievmlletsr rynpgsesit flkdfsynre dfakaglqve finpifefsr amnelqlnda efalliaisi
fsadrpnvqd qlqverlqht yvealhayvs ihhphdrlmf prmlmklvsl rtlssvhseq vfalrlqdkk lppllseiwd
vhe

LXR-b (NR1H2) isoforma 1: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 29)

ucgucaaguuucacgcuccgccccucuuccggacgugacgcaagggcgggguugccggaagaaguggcgaaguuac
uuuugaggguauuugaguagcggcgguguucagggguaaagaggaggacgaagaaaagcagagcaagggaaccc
agggcaacaggaguaguucacuccgcgagaggccguccacgagacccccgcgcgcagccaugagccccgcccccgcu
guugcuuggagaggggcgggaccuggagagaggcugcuccgugaccccaccauguccucuccuaccacgaguuccc
uggauaccccccugccuggaaauggcccccucagccuggcgcccccuucuucuucacccacuguaaaggaggagggu
ccggagccguggcccggggguccggacccugaugucccaggcacugaugaggccagcucagccugcagcacagacug
ggucaucccagaucccgaagaggaaccagagcgcaagcgaaagaagggcccagccccgaagaugcugggccacgagcu
uugccgugucuguggggacaaggccuccggcuuccacuacaacgugcucagcugcgaaggcugcaagggcuucuuc
cggcgcaguguggguccguggugggggccaggcgcuaugccugccggggugggcggaaccugccagauggacgcuuuca
ugcggcgcaagugccagcagugccggcugcgcaagugcaaggaggcagggaugagggagcagugcguccuuucuga
agaacagauccggaagaagaagauucggaaacaacagcagcaggagucacagucacagucgcagucaccuguggggcc
gcagggcagcagcagcucagccucugggccuggggcuucccccugguggaucugaggcaggcagccagggcuccggg
gaaggcgaggguguccagcuaacagcggcucaagaacuaaugauccagcaguuggugggcggcccaacugcagugcaa
caaacgcuccuucuccgaccagcccaaagucacgcccuggccccugggcgcagacccccagucccgagaugcccgcca
gcaacgcuuugcccacuucacggagcuggccaucaucucaguccaggagaucguggacuucgcuaagcaagugccug
guuuccugcagcugggccgggaggaccagaucgcccuccugaaggcauccacuaucgagaucaugcugcuagagaca
gccaggcgcuacaaccacgagacagaguguaucaccuucuugaaggacuucaccuacagcaaggacgacuuccaccgu
gcaggccugcagguggaguucaucaaccccaucuucgaguucucgcgggccaugcggcggcugggccuggacgacg
cugaguacgcccugcucaucgccaucaacaucuucucggccgaccggcccaacgugcaggagccgggccgcguggag
gcguugcagcagcccuacguggaggcgcugcuguccuacacgcgcaucaagaggccgcaggaccagcugcgcuuccc
gcgcaugcucaugaagcuggugagccugcgcacgcugagcucugugcacucggagcaggucuucgccuugcggcuc
caggacaagaagcugccgccucugcugucggagaucugggacguccacgagugaggggcuggccacccagccccaca
gccuugccugaccacccuccagcagauagacgccggcaccccuuccucuuccuaggguggaaggggcccugggccga
gccuguagaccuaucggcucucaucccuugggauaagccccaguccagguccaggaggcucccucccugcccagcga
gucuuccagaaggggugaaaggguugcaggucccgaccacugacccuucccggcugcccucccucccccagcuuacac
cucaagcccagcacgcagugcaccuugaacagagggaggggaggacccauggcucucccccccuagcccgggagaccag
ggccuuccucuuccucugcuuuuauuuaauaaaaacuaaaaacagaaacaggaaaauaaaaauaugaauacaauccagc
ccggagcuggagugca

LXR-b (NR1H2) isoforma 1: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 30)

mssptssld tplpgngppq pgapsssptv keegpepwpg gpdpdvpgtd eassacstdw vipdpeeepe
rkrkkgpapk mlghelcrvc gdkasgfhyn vlscegckgf frrsvvrgga rryacrgggt cqmdafmrrk
cqqcrlrkck eagmreqcvl seeqirkkki rkqqqqesqs qsqspvgpqg ssssasgpga spggseagsq
gsgegegvql taaqelmiqq lvaaqlqcnk rsfsdqpkvt pwplgadpqs rdarqqrfah ftelaiisvq
eivdfakqvp gflqlgredq iallkastie imlletarry nhetecitfl kdftyskddf hraglqvefi npifefsram
rrlgldddaey alliainifs adrpnvqepg rvealqqpyv eallsytrik rpqdqlrfpr mlmklvslrt lssvhseqvf
alrlqdkklp pllseiwdvh e

LXR-b (NR1H2) isoforma 2: secuencia de ARN (SEQ ID NO: 31)

ucgucaaguuucacgcuccgccccucuuccggacgugacgcaagggcgggguugccggaagaaguggcgaaguuac
uuuugaggguauuugaguagcggcggugugucaggggcuaaagaggaggacgaagaaaagcagagcaagggaaccc
agggcaacaggaguaguucacuccgcgagaggccguccacgagacccccgcgcgcagccaugagccccgcccccgcu
guugcuuggagaggggcgggaccuggagagaggcugcuccgugaccccaccauguccucuccuaccacgaguuccc
uggauacccccugccuggaaauggcccccucagccuggcgccccuucuucuucacccacuguaaaggaggagggu
ccggagccguggcccggggguccggacccugaugucccaggcacugaugaggccagcucagccugcagcacagacug
gggcguccuuucugaagaacagauccggaagaagaagauucggaaacaacagcagcaggagucacagucacagucgc
agucaccuguggggccgcagggcagcagcagcucagccucugggccuggggcuucccccugguggaucugaggcagg
cagccagggcuccggggaaggcgaggguguccagcuaacagcggcucaagaacuaaugauccagcaguugguggcg
gcccaacugcagugcaacaaacgcuccuucuccgaccagcccaaagucacgcccuggccccugggcgcagacccccag
ucccgagaugcccgccagcaacgcuuugcccacuucacggagcuggccaucaucucaguccaggagaucguggacuu
cgcuaagcaagugccuggguuuccugcagcugggccgggaggaccagaucgcccuccugaaggcauccacuaucgaga
ucaugcugcuagagacagccaggcgcuacaaccacgagacagaguguaucaccuucuugaaggacuucaccuacagca
aggacgacuuccaccgugcaggccugcagguggaguucaucaaccccaucuucgaguucucgcgggccaugcggcgg
cugggccuggacgacgcugaguacgcccugcucaucgccaucaacaucuucucggccgaccggcccaacgugcagga
gccgggccgcguggaggcguugcagcagcccuacguggaggcgcugcuguccuacacgcgcaucaagaggccgcag
gaccagcugcgcuucccgcgcaugcucaugaagcuggugagccugcgcacgcugagcucugugcacucggagcagg
ucuucgccuugcggcuccaggacaagaagcugccgccucugcugucggagaucugggacguccacgagugaggggc
uggccacccagccccacagccuugccugaccacccuccagcagauagacgccggcacccccuuccucuuccuagggugg
aaggggcccugggccgagccuguagaccuaucggcucucaucccuugggauaagccccaguccagguccaggaggcu
cccucccugcccagcgagucuuccagaaggggugaaaggguugcaggucccgaccacugacccuucccggcugcccu
cccucccagcuuacaccucaagcccagcacgcagugcaccuugaacagagggaggggaggacccauggcucucccc
cuagcccgggagaccagggccuuccucuuccucugcuuuuauuuaauaaaaacuaaaaacagaaacaggaaaauaaaa
uaugaauacaauccagcccggagcuggagugca

LXR-b (NR1H2) isoforma 2: secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 32)

mssptssld tplpgngppq pgapsssptv keegpepwpg gpdpdvpgtd eassacstdw gvlseeqirk
kkirkqqqqe sqsqsqspvg pqgssssasg pgaspggsea gsqgsgegeg vqltaaqelm iqqlvaaqlq
cnkrsfsdqp kvtpwplgad pqsrdarqqr fahftelaii svqeivdfak qvpgflqlgr edqiallkas tieimlleta
rrynheteci tflkdftysk ddfhraglqv efinpifefs ramrrlgldd aeyalliain ifsadrpnvq epgrvealqq
pyveallsyt rikrpqdqlr fprmlmklvs lrtlssvhse qvfalrlqdk klppllseiw dvhe

Secuencia de has-miR-199a-1 (SEQ ID NO: 33)

GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGGCUCUCAAUGUGUACAGU
AGUCUGCACAUUGGUUAGGC

Secuencia de has-miR-199a-2 (SEQ ID NO: 34)

AGGAAGCUUCUGGAGAUCCUGCUCCGUCGCCCCAGUGUUCAGACUACCUGU
UCAGGACAAUGCCGUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUGGGCAAG
GGAGAGCA

Secuencia de has-miR-1908 (SEQ ID NO: 35)

CGGGAAUGCCGCGGCGGGGACGGCGAUUGGUCCGUAUGUGUGGUGCCACCG
GCCGCCGGCUCCGCCCCGGCCCCCGCCCC

Secuencia de has-miR-7-1 (SEQ ID NO: 36)

UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU
AGAUAACUAAAUCGACAACAAAUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUG
CCUCUACAG

Secuencia de has-miR-7-2 (SEQ ID NO: 37)

CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCCAUCUGGAAGACUAGUGAUUUUGU
UGUUGUCUUACUGCGCUCAACAACAAAUCCCAGUCUACCUAAUGGUGCCAG
CCAUCGCA

Secuencia de has-miR-7-3 (SEQ ID NO: 38)

AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGU
UGUUCUGAUGUACUACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGCAGACU
CCCUUCGAC

Secuencia de miR-Zip 199a-3p (SEQ ID NO: 39)

GATCCGACAGTAGCCTGCACATTAGTCACTTCCTGTCAGTAACCAATGTGCAG
ACTACTGTTTTTTGAATT

Secuencia de miR-Zip 199a-5p (SEQ ID NO: 40)

GATCCGCCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAGTCT
GA
ACACTGGGTTTTTGAATT

Secuencia de miR-Zip 1908 (SEQ ID NO: 41)

GATCCGCGGCGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC
CCGCCGTTTTTGAATT

Secuencia de miR-Zip 7 (SEQ ID NO: 42)

GATCCGTGGAAGATTAGTGAGTTTATTATCTTCCTGTCAGACAACAAAATCAC
TAGTCTTCCATTTTTGAATT

Los miembros de esta red pueden usarse como dianas para tratar melanoma metastásico. Además, los miembros pueden usarse como biomarcadores para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un melanoma metastásico o para determinar un pronóstico o seguimiento del paciente que tiene el trastorno. De acuerdo con esto, la presente invención engloba métodos para tratar melanoma metastásico por la toma como diana de uno o más de los miembros, métodos para determinar la eficacia de los regímenes terapéuticos para inhibir el cáncer, y métodos para identificar un agente anticancerosos. También se proporcionan métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, melanoma metastásico, y métodos para cribar sujetos que se piensa que están en riesgo de desarrollar el trastorno. La invención también engloba varios kits adecuados para llevar a cabo los métodos mencionados anteriormente.

Polipéptidos ApoE

El término “polipéptido o péptido”, tal y como se usa en la presente memoria, incluye versiones de fusión o quiméricas producidas recombinantemente o sintéticamente de cualquiera de los supresores de metástasis mencionados anteriormente, que tienen los dominios o partes particulares que están implicados en la red. El término también engloba un análogo, fragmento, elongación o derivado del péptido (p. ej., que tienen una metionina añadida en el amino terminal, útil para la expresión en células procariotas).

“Polipéptido de apolipoproteína o polipéptido ApoE”, tal y como se usa en la presente memoria, significa un péptido, fármaco, o compuesto que mimetiza una función de la apolipoproteína nativa bien *in vivo* o *in vitro* incluyendo análogos, fragmentos, elongaciones o derivados de la apolipoproteína que son un péptido con una longitud de entre 10 y 200 residuos de aminoácidos, dichos péptidos pueden contener aminoácidos bien naturales, o no naturales, que contienen enlaces amida. Los fragmentos de péptidos de apolipoproteína pueden modificarse para mejorar su estabilidad o biodisponibilidad *in vivo* como se conoce en la técnica y pueden contener compuestos orgánicos unidos a las cadenas laterales de los aminoácidos a través de una variedad de enlaces.

En un aspecto, la invención es un método para usar un péptido apoEp1.B aislado que tiene la secuencia de aminoácidos TQQIRLQAEIFQAR (murino) (SEQ. ID. No. 43) o AQQIRLQAEAFQAR (humano) (SEQ. ID. No. 44) o un análogo, fragmento, elongación o derivado del péptido. La invención también incluye una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido apoEpI.B, o un análogo, fragmento, elongación o derivado del mismo.

El término “análogo” incluye cualquier péptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos sustancialmente idéntica al péptido nativo en la que uno o más residuos se han sustituido conservativamente con un residuo con una

funcionalidad similar y que presenta la capacidad de mimetizar al péptido nativo. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrofóbico) tal como alanina, isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

La expresión “sustitución conservativa” también incluye el uso de un residuo derivatizado químicamente en lugar de un residuo no derivatizado, siempre que dicho polipéptido presente la actividad requerida. Los análogos de los péptidos incluyen péptidos que tienen las siguientes secuencias: TAQIRLQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:45); TQAIRLQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:46); TQQARLQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:47) y TQQIALQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:48).

“Derivado” se refiere a un péptido que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente por la reacción de un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar hidrocloruros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Para ejemplos: la 4-hidroxiprolina puede sustituirse con prolina; la 5-hidroxilisina puede sustituirse con lisina; la 3-metilhistidina puede sustituirse con histidina; la homoserina puede sustituirse con serina; y la ornitina puede sustituirse con lisina. Los polipéptidos de la presente invención también incluyen cualquier polipéptido que tiene una o más adiciones y/o deleciones o residuos respecto a la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se muestra en la presente memoria, siempre que se mantenga la actividad requerida.

El término “fragmento” se refiere a cualquier péptido objeto que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos más corta que la de un péptido cuya secuencia de residuos de aminoácidos se muestra en la presente memoria.

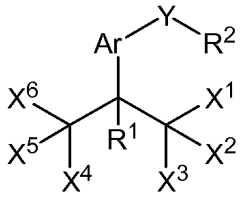
El término “elongación” se refiere a cualquier péptido objeto que tiene una secuencia de aminoácidos más larga por uno o más aminoácidos (bien en el extremo carboxi o amino terminal) que la de un péptido de la presente invención. Preferiblemente, la elongación se produce en el extremo amino terminal. Los fragmentos y elongaciones de los péptidos incluyen péptidos que tienen las siguientes secuencias: QTQQIRLQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:49) y QQIRLQAEIFQAR (SEQ.ID.NO.:50).

Los polipéptidos ApoE y los métodos para su preparación se describen en la patente de EE.UU. No. 6.652.860.

Agonistas de LXR (Solo la materia abarcada por el alcance de las reivindicaciones forma parte de la invención).

Los métodos de la invención pueden incluir administrar un agonista de LXR para la prevención y tratamiento de metástasis. El agonista de LXR puede ser un compuesto según la Fórmula I, II, III, o IV mostradas a continuación.

La Fórmula I se proporciona a continuación:



Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde

Ar es un grupo arilo;

R^1 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

-OH, $-CO_2H$, -O-alquilo(C_1-C_7), -OC(O)- , -alquilo(C_1-C_7), -O-heteroalquilo(C_1-C_7), -OC(O)-heteroalquilo(C_1-C_7), $-NH_2$, -NHalquilo(C_1-C_7), -N(alquilo(C_1-C_7))$_2$ y -NH-S(O)$_2$alquilo(C_1-C_5);

R^2 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

alquilo(C_1-C_7), heteroalquilo(C_1-C_7), arilo y arilalquilo(C_1-C_7);

X^1, X^2, X^3, X^4, X^5 y X^6 son cada uno independientemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

H, alquilo(C^1-C^5), heteroalquilo(C^1-C^5), F y Cl, con la condición de que no más de tres de X^1 a X^6 son H, alquilo(C^1-C^5), heteroalquilo(C^1-C^5); e

Y es un grupo conector divalente seleccionado del grupo que consiste en:

-$N(R^{12})S(O)_m$-, -$N(R^{12})S(O)_mN(R^{13})$-, -$N(R^{12})C(O)$-, -$N(R^{12})C(O)N(R^{13})$-, - $N(R^{12})C(S)$- y -$N(R^{12})C(O)O$-;

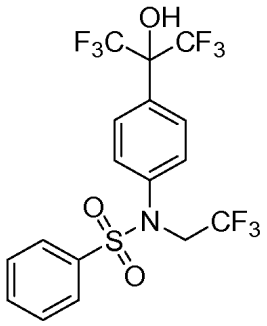
en donde R^{12} y R^{13} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en:

H, alquilo(C_1-C_7), heteroalquilo(C_1-C_7), arilo y arilalquilo(C_1-C_7), y opcionalmente cuando Y es -$N(R^{12})S(O)_m$- o -$N(R^{12})S(O)_mN(R^{13})$-, R^{12} forma un anillo de cinco o seis miembros fusionado a Ar o a R^2 a través de la unión covalente a Ar o a R^2 , respectivamente; y el subíndice m es un número entero de 1 a 2;

con la condición de que cuando R^1 es OH, e -Y-R^2 es -$N(R^{12})S(O)_m$-R^2 o -$N(R^{12})C(O)N(R^{13})$-R^2 y está unido a una posición para respecto al carbono cuaternario unido a Ar, y cuando R^2 es fenilo, bencilo, o benzoilo, entonces i) al menos uno de R^{12} o R^{13} es distinto de hidrógeno y contiene un sustituyente aceptor de electrones, o ii) R^2 está sustituido con un resto distinto de amino, acetamido, dialquil(C_1-C_7)amino, alquil(C_1-C_7)amino, halógeno, hidroxi, nitro, o alquilo(C_1-C_7), o iii) la parte de anillo benceno de R^2 está sustituida con al menos tres grupos seleccionados independientemente además del grupo Y o punto de unión a Y.

En algunas realizaciones, Y es -$N(R^{12})S(O)_2$- y R^1 es OH.

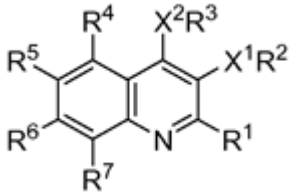
De acuerdo con esto, los compuestos de Fórmula I incluyen, pero no están limitados a, el compuesto con la estructura mostrada a continuación:



1

Los compuestos de Fórmula I pueden sintetizarse como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.316.503.

La Fórmula II se proporciona a continuación:



Fórmula II

en donde:

R^1 es -H;

X^1 es un enlace, alquilo C_1 a C_5, -C(O)-, -C(=CR^8R^9)-, -O-, -$S(O)_t$-, -NR^8-, -CR^8R^9- , -CHR^{23}, -$CR^8(CR^9)$-, -$C(CR^8)_2$-, -$CR_8(OC(O)R^9)$-, -C=NOR^9-, -$C(O)NR^8$-, -CH_2O-, -CH_2S-, - CH_2NR^8-, -OCH_2-, -SCH_2-, -NR^8CH_2-. o  ;

R^2 es H, alquilo C_1 a C_6, alquenilo C_2 a C_6, alquinilo C_2 a C_6, cicloalquilo C_3 a C_6, $-CH_2OH$, arilalquilo C_7 a C_{11}, fenilo, naftilo, perfluoroalquilo C_1 a C_3, CN, $C(O)NH_2$, CO_2R^{12} o fenilo sustituido independientemente con uno o más de los grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, alquenilo C_2 a C_4, alquinilo C_2 a C_4, alcoxi C_1 a C_3, perfluoroalquilo C_1 a C_3, halógeno, $-NO_2$, $-NR^8R^9$, -CN, -OH, y alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 5 flúor, o R^2 es un heterociclo seleccionado del grupo que consiste en piridina, tiofeno, bencisoxazol, benzotiofeno, oxadiazol, pirrol, pirazol, imidazol, y furano, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, alcoxi C_1 a C_3, perfluoroalquilo C_1 a C_3, halógeno, $-NO_2$, $-NR^8R^9$, -CN, y alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 5 flúor;

X^2 es un enlace o $-CH_2-$;

R^3 es fenilo, naftilo, o fenilo o naftilo sustituido independientemente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, hidroxi, fenilo, acilo, halógeno, $-NH_2$, -CN, $-NO_2$, alcoxi C_1 a C_3, perfluoroalquilo C_1 a C_3, alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 5 flúor, $NR^{14}R^{15}$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)NR^{10}R^{11}$, $-C(O)NR^{11}A$, $-C\equiv CR^8$, $-CH=CHR^8$, -WA, -C≡CA, -CH=CHA, -WYA, - $WYNR^{11}$-A, $-WYR^{10}$, $-WY(CH2)_jA$, $-WCHR^{11}(CH2)_jA$, $-W(CH2)_jA$, $-W(CH2)_jR^{10}$, - $CHR^{11}W(CH2)jR^{10}$, $-CHR^{11}W(CH_2)_jA$, $-CHR^{11}NR^{12}YA$, $-CHR^{11}NR^{12}YR^{10}$, pirrol, - $W(CH_2)_jA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CR^{18}R^{19})A(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-(CH_2)_jWA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, -CH=CHA(CH2)$_k$D(CH2)pZ, $-C\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CH_2)_jC\equiv CA(CH_2)_kD(CH2)_pZ$, y $-W(CH_2)_jZ$, o R^3 es un heterociclo seleccionado de pirimidina, tiofeno, furano, benzotiofeno, indol, benzofurano, bencimidazol, benzotiazol, benzoxazol, y quinolina, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, alcoxi C_1 a C_3, hidroxi, fenilo, acilo, halógeno, $-NH_2$, -CN, $-NO_2$, perfluoroalquilo C_1 a C_3, alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 5 flúor, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)$ $NR^{10}R^{11}$, $-C(O)NR^{11}A$, $-C\equiv CR^8$, $-CH=CHR^8$, -WA, -C≡CA, -CH=CHA, -WYA, $-WYR^{10}$, - $WY(CH_2)_jA$, $-W(CH_2)_jA$, $-W(CH_2)_jR^{10}$, $-CHR^{11}W(CH_2)_jR^{10}$, $-CHR^{11}W(CH_2)_jA$, $-CHR^{11}NR^{12}YA$, $-CHR^{11}NR^{12}YR^{10}$, $-WCHR^{11}(CH_2)_jA$, $-W(CH_2)_jA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CR^{18}R^{19})A(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-(CH_2)_jWA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, -CH=CHA$(CH_2)_kD(CH_2)_p$Z, $-C\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CH_2)_jC\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, y $-W(CH_2)_jZ$;

W es un enlace, -O-, -S-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-NR^{11}-$, o $-N(COR^{12})-$;

Y es $-CO-$, $-S(O)^2-$, $-CONR^{13}$,$-CONR^{13}CO-$, $-CONR^{13}SO_2-$, -C(NCN)-, $-CSNR^{13}$, - $C(NH)NR^{13}$, o -C(O)O-;

j es 0 a 3;

k es 0 a 3;

t es 0 a 2;

D es un enlace, -CH=CH-, -C≡C-, -C=,-C(O)-, fenilo, -O-, -NH-, -S-, $-CHR^{14}-$, - $CR^{14}R^{15}-$, $-OCHR^{14}$, $-OCR^{14}R^{15}-$, o -CH(OH)CH(OH)-;

p es 0 a 3;

Z es $-CO_2R^{11}$, $-CONR^{10}R^{11}$, $-C(NR^{10})NR^{11}R^{12}$, $-CONH_2NH_2$, -CN, $-CH_2OH$, $-NR^{16}R^{17}$, fenilo, $CONHCH(R^{20})COR^{12}$, ftalamida, pirrolidina-2,5-diona, tiazolidina-2,4-diona, tetrazolilo, pirrol, indol, oxazol, 2-tioxo-1,3-tiazolinin-4-ona, aminas C_1 a C_7, aminas cíclicas C_3 a C_7, o alquilo C_1 a C_3 sustituido con uno a dos grupos OH; en donde dicho pirrol está sustituido opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en $-CO_2CH_3$, $-CO_2H$, $-COCH_3$, $-CONH_2$, y -CN;

en donde dichas aminas C_1 a C_7 están sustituidas opcionalmente con uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, halógeno, $-OCH_3$, y -C≡CH;

en donde dicho fenilo está sustituido opcionalmente con CO_2R^{11}, y en donde dichas aminas cíclicas C_3 a C_7 están sustituidas opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, $-CH_2OH$, alquilo C_1 a C_3, $-CH_2OCH_3$, $-CO_2CH_3$, y $-CONH_2$, y en donde dicho oxazol está sustituido opcionalmente con $CH_2CO_2R^{11}$;

A es fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indano o bifenilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C_1 a C_3, alquenilo C_2 a C_4, alquinilo C_2 a C_4, acilo, hidroxi, halógeno, -CN, $-NO_2$, $-CO_2R^{11}$, - $CH_2CO_2R^{11}$, fenilo, perfluoroalcoxi C_1 a C_3, perfluoroalquilo C_1 a C_3, $-NR^{10}R^{11}$, - $CH_2NR^{10}R^{11}$, $-SR^{11}$, alquilo C_1 a C_6 sustituido con 1 a 5 flúor, alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 2 grupos -OH, alcoxi C_1 a C_6 sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor, o fenoxi sustituido opcionalmente con 1 a 2 grupos CF_3; o

A es un heterociclo seleccionado de pirrol, piridina, piridina-N-óxido, pirimidina, pirazol, tiofeno, furano, quinolina, oxazol, tiazol, imidazol, isoxazol, indol, benzo[1,3]-dioxol, benzo[1,2,5]-oxadiazol, isocromen-1-ona, benzotiofeno, benzofurano, 2,3-di- 5 hidrobenzo[1,4]-dioxina, biteinilo, quinazolin-2,4-9[3H]diona, y 3-H-isobenzofuran-1-ona, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres grupos seleccionados independientemente de

halógeno, alquilo C_1 a C_3, acilo, hidroxi, -CN, $-NO_2$, perfluoroalquilo C_1 a C_3, $-NR^{10}R^{11}$, $-CH_2NR^{10}R^{11}$, $-SR^{11}$, alquilo C_1 a C_3 sustituido con 1 a 5 flúor, y alcoxi C_1 a C_3 sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor;

R^4, R^5, y R^6 son cada uno, independientemente, -H o -F;

R^7 es alquilo C_1 a C_4, perfluoroalquilo C_1 a C_4, halógeno, $-NO_2$, -CN, fenilo o fenilo sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C_1 a C_2 y OH;

con la condición de que si X_1R^2 forma hidrógeno, entonces R^3 se selecciona de:

(a) fenilo sustituido con $-W(CH_2)_jA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CR^{18}R^{19})A(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-(CH_2)_jWA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-CH=CHA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-C\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, o $-W(CH_2)_jC\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, en donde el resto fenilo está además sustituido opcionalmente con uno o dos grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_2, perfluoroalquilo C_1 a C_2, halógeno, y CN; y

(b) un heterociclo seleccionado de pirimidina, tiofeno, y furano, cada uno de los cuales está sustituido con uno de $-W(CH_2)_jA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-W(CR^{18}R^{19})A(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-(CH2)_jWA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-CH=CHA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, $-C\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$, o $-W(CH_2)_jC\equiv CA(CH_2)_kD(CH_2)_pZ$;

cada R^8 es independientemente -H, o alquilo C_1 a C_3;

cada R^9 es independientemente- H, o alquilo C_1 a C_3;

cada R^{10} es independientemente -H, -CH, alcoxi C_1 a C_3, alquilo C_1 a C_7, alquenilo C_3 a C_7, alquinilo C_3 a C_7, cicloalquilo C_3 a C_7, $-CH_2CH_2OCH_3$, 2-metil-tetrahidro-furano, 2-metil-tetrahidro-pirano, 4-metil-piperidina, morfolina, pirrolidina, o fenilo sustituido opcionalmente con uno o dos grupos alcoxi C_1 a C_3, en donde dicho alquilo C_1 a C_7 está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de alcoxi C_1 a C_3, tioalcoxi C_1 a C_3, y CN;

cada R^{11} es independientemente -H, alquilo C_1 a C_3 o R^{22}; o R^{10} y R^{11}, cuando están unidos al mismo átomo, forman junto con dicho átomo:

un anillo saturado de 5 a 7 miembros, sustituido opcionalmente con 1 a 2 grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, OH y alcoxi C_1-C_3; o un anillo de 5 a 7 miembros que contiene 1 o 2 heteroátomos,

sustituido opcionalmente con 1 a 2 grupos seleccionados independientemente de alquilo C_1 a C_3, OH y alcoxi C_1-C_3;

cada R^{12} es independientemente -H, o alquilo C_1 a C_3;

cada R^{13} es independientemente -H, o alquilo C_1 a C_3;

cada R^{14} y R^{15} es, independientemente, alquilo C_1 a C_7, cicloalquilo C_3 a C_8, alquenilo C_2 a C_7, alquinilo C_2 a C_7, -CH, -F, arilalquilo C_7 a C_{14}, donde dicho arilalquilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de NO_2, alquilo C_1 a C_6, perhaloalquilo C_1 a C_3, halógeno, $CH_2CO_2R^{11}$, fenilo y alcoxi C_1 a C_3, o R^{12} y R^{15} junto con el átomo al que están unidos pueden formar un anillo saturado de 3 a 7 miembros;

cada R^{16} y R^{17} es, independientemente, hidrógeno, alquilo C_1 a C_3, alquenilo C_1 a C_3, alquinilo C_1 a C_3, fenilo, bencilo o cicloalquilo C_3 a C_8, en donde dicho alquilo C_1 a C_3 está sustituido opcionalmente con un grupo OH, y en donde dicho bencilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados de alquilo C_1 a C_3 y alcoxi C_1 a C_3; o R^{16} y R^{17}, junto con el átomo al que están unidos, pueden formar un heterociclo de 3 a 8 miembros que está sustituido opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1 a C_3, -OH, CH_2OH, $-CH_2OCH_3$,$-CO_2CH_3$, y $-CONH_2$;

cada R^{18} y R^{19} es, independientemente, alquilo C_1 a C_3;

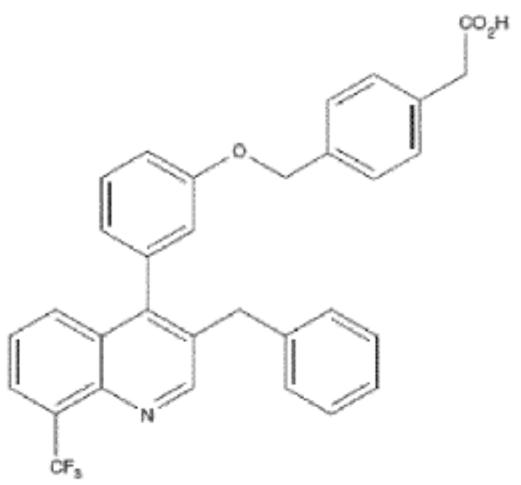
cada R^{20} es independientemente H, fenilo, o la cadena lateral de un alfa aminoácido natural;

cada R^{22} es independientemente arilalquilo sustituido opcionalmente con CH_2COOH; y

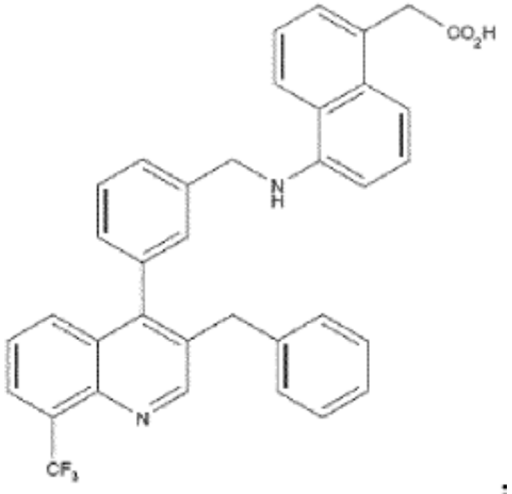
cada R_{23} es fenilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

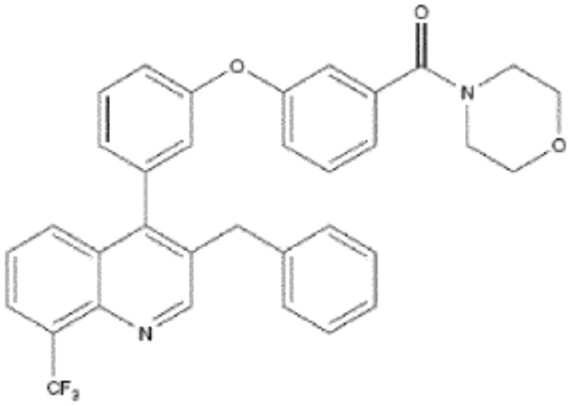
Los compuestos de Fórmula II pueden sintetizarse como se describe en la patente de EE.UU. No. 7.576.215. El compuesto de fórmula II puede ser cualquiera de los compuestos 26-32, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.



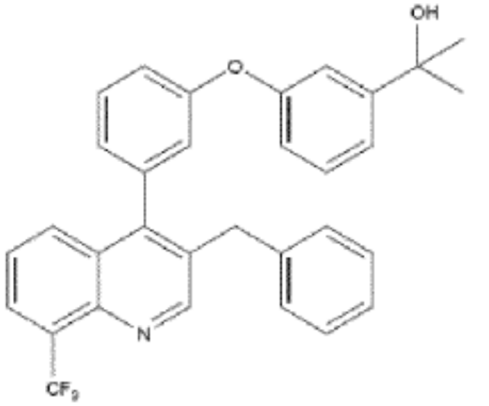
26



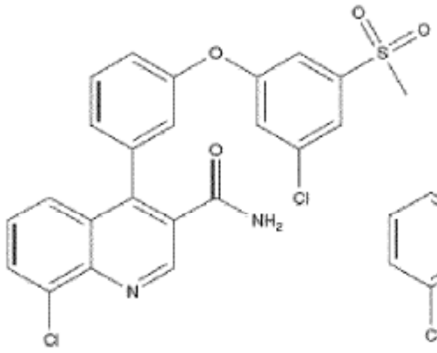
27

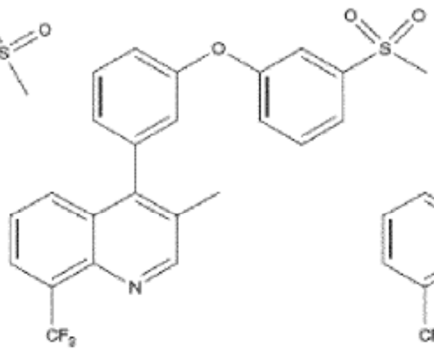


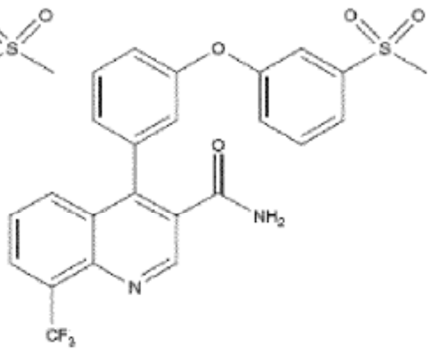
28



29

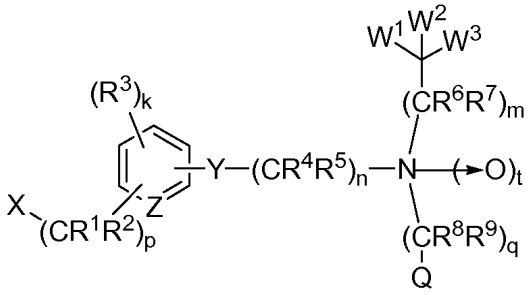






30 31 32

La Fórmula III se proporciona a continuación:



Fórmula III

en donde:

X se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1-C_8, halo, -OR^{10}, -$NR^{10}R^{11}$, nitro, ciano, -$COOR^{10}$, o -COR^{10}.

Z es CH, CR^3 o N, en donde cuando Z es CH o CR^3, k es 0-4 y t es 0 o 1, y cuando Z es N, k es 0-3 y t es 0;

Y se selecciona de -O-, -S-, -$N(R^{12})$-, y -$C(R^4)(R^5)$-;

W^1 se selecciona de alquilo C_1-C_6, alquilo C_o-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, arilo y Het, en donde dicho alquilo C_1-C_8, cicloalquilo C_3-C_8, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6,-alquilo C_0-C_6-CO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-C(O)SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-SO_3H, -alquilo C_0-C_6-$SO_2NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-SOR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)NR^{13}R^{14}$, y -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, donde dicho alquilo C_1-C_6, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

W^2 se selecciona de H, halo, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-CO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-C(O)SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OCONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-Ar y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7, en donde dicho alquilo C_1-C_6 está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo, y en donde los restos cicloalquilo C_3-C_7, Ar y Het de dicho -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-Ar y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7 están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-CO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-C(O)SR^{12} , -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-SO_3H, -alquilo C_0-C_6-$SO_2NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-SOR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)NR^{13}R^{14}$, y -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, donde dicho alquilo C_1-C_6, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

W^3 se selecciona del grupo que consiste en: H, halo, alquilo C_1-C_6, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-CO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-C(O)SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OCONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_1-C_6-Ar y -alquilo C_1-C_6-cicloalquilo C_3-C_7, en donde dicho alquilo C_1-C_6 está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

Q se selecciona de cicloalquilo C_3-C_8, Ar y Het; en donde dicho cicloalquilo C_3-C_8, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-CO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-C(O)SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-SO_3H, -alquilo C_0-C_6-$SO_2NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-SOR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)NR^{13}R^{14}$, y -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, donde dicho alquilo C_1-C_6 está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

p es 0-8;

n es 2-8;

m es 0 o 1;

q es 0 o 1;

t es 0 o 1;

cada R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H, halo, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_1-C_6-Het, -alquilo C_1-C_6-Ar y -alquilo C_1-C_6-cicloalquilo C_3-C_7, o R^1 y R^2 junto con el carbono al que están unidos forman un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-5 miembros, en donde dicho anillo heterocíclico contiene uno, o más heteroátomos seleccionados de N, O, y S, donde cualquiera de dicho alquilo C_1-C_6 está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

cada R^3 es el mismo o diferente y se selecciona independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-Ar, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_6-$CO2R^{12}$, -alquilo C_0-C_6-$C(O)SR^{12}$, -alquilo C_0-C_6-$CONR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-COR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SR^{12}, -alquilo C_0-C_6-OR^{12}, -alquilo C_0-C_6-SO_3H, -alquilo C_0-C_6-$SO_2NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-SO_2R^{12}, -alquilo C_0-C_6-SOR^{15}, -alquilo C_0-C_6-$OCOR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)NR^{13}R^{14}$, -alquilo C_0-C_6-$OC(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)OR^{15}$, -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}C(O)NR^{13}R^{14}$, y -alquilo C_0-C_6-$NR^{13}COR^{15}$, en donde dicho alquilo C_1-C_6 está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

cada R^4 y R^5 se selecciona independientemente de H, halo, alquilo C_1-C_6, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-Ar y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C_1-C_6, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-Ar y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7;

R^8 y R^9 se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C_1-C_6, -alquilo C_0-C_6-Het, -alquilo C_0-C_6-Ar y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7;

R^{10} y R^{11} se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C_1-C_{12}, alquenilo C_3-C_{12}, alquinilo C_3-C_{12}, -alquilo C_0-C_8-Ar, -alquilo C_0-C_8-Het, -alquilo C_0-C_8-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_8-O-Ar, -alquilo C_0-C_8-O-Het, -alquilo C_0-C_8-O-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_8-$S(O)_x$-alquilo C_0-C_6, -alquilo C_0-C_8-$S(O)_x$-Ar, -alquilo C_0-C_8-$S(O)_x$-Het, -alquilo C_0-C_8-$S(O)_x$-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_8-NH-Ar, -alquilo C_0-C_8-NH-Het, -alquilo C_0-C_8-NH-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_8-N(alquilo C_1-C_4)-Ar, -alquilo C_0-C_8-N(alquilo C_1-C_4)-Het, -alquilo C_0-C_8-N(alquilo C_1-C_4-cicloalquilo C_3-C_7, -alquilo C_0-C_8-Ar, -alquilo C_0-C_8-Het y -alquilo C_0-C_8-cicloalquilo C_3-C_7, donde x es 0, 1, o 2, o R^{10} y R^{11}, junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 4-7 miembros que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de N, O, y S, en donde dicho alquilo C_1-C_{12}, alquenilo C_3-C_{12}, o alquinilo C_3-C_{12} está sustituido opcionalmente con uno o más de los sustituyentes seleccionados independientemente del grupo halo,-OH, -SH, $-NH_2$, -NH(alquilo C_1-C_6 no sustituido), -N(alquilo C_1-C_6 no sustituido)(alquilo C_1-C_6 no sustituido), -Oalquilo C_1-C_6 no sustituido, $-CO_2H$, $-CO_2$(alquilo C_1-C_6 no sustituido), $-CONH_2$, -CONH(alquilo C_1-C_6 no sustituido), - CON(alquilo C_1-C_6 no sustituido)(alquilo C_1-C_6 no sustituido), $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2$NH(alquilo C_1-C_6 no sustituido) y $-SO_2$N(alquilo C_1-C_6 no sustituido)(alquilo C_1-C_6 no sustituido);

R^{12} se selecciona de H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-Ar, -alquilo C_0-C_6-Het y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7;

cada R^{13} y cada R^{14} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-Ar, -alquilo C_0-C_6-Het y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7, o R^{13} y R^{14} junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4-7 miembros que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de N, O, y S;

y R^{15} se selecciona de alquilo C_1-C_6, alquenilo C_3-C_6, alquinilo C_3-C_6, -alquilo C_0-C_6-Ar, -alquilo C_0-C_6-Het y -alquilo C_0-C_6-cicloalquilo C_3-C_7;

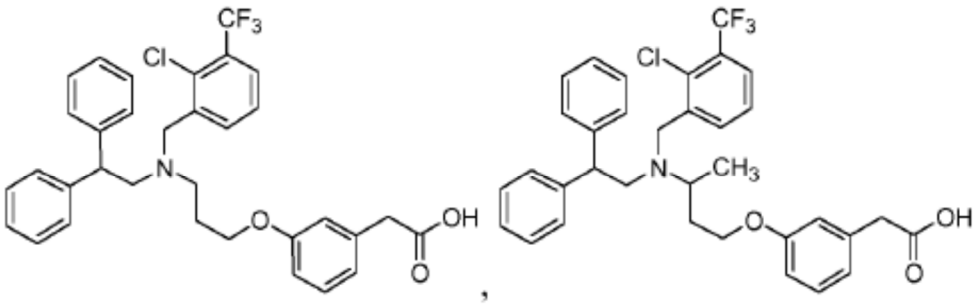
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, X es hidrógeno, p es 0, t es 0, Z es CH, e Y es -O-.

En realizaciones adicionales, X es hidrógeno, p es 0, t es 0, Z es CH, e Y es -O-, W^1 y W^2 son fenilo, W^3 es hidrógeno, q es 1, y R^8 y R^9 son hidrógeno.

En otras realizaciones, X es hidrógeno, p es 0, t es 0, Z es CH, e Y es -O-, W^1 y W^2 son fenilo, W^3 es hidrógeno, q es 1, R^8 y R^9 son hidrógeno, y Q es Ar.

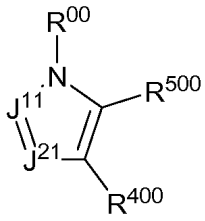
De acuerdo con esto, los compuestos de Fórmula III incluyen, pero no están limitados a, los compuestos con las estructuras mostradas a continuación GW3965 **2** y SB742881 **25**:



2, 25

Los compuestos de Fórmula III pueden sintetizarse como se describe en la patente de EE.UU. No. 7.365.085 y 7.560.586.

La Fórmula IV se muestra a continuación:



Fórmula IV

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde:

J^{11} es-N= y J^{21} es -CR^{300}-, o J^{11} es -CR^{200}- y J21 es =N-;

R^{00} es G^1, G^{21}, o R^N;

R^{200} es G^1, G^{21} o R^C;

R^{300} y R^{400} son independientemente R^C o Q, con la condición de que uno y solo uno de R^{300}, R^{400}, y R^{500} sea Q;

Q es cicloalquilo C_{3-6}, heteroarilo o heterociclilo, cada uno sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^Q, o Q es -X- Y-Z; en donde cada R^Q es independientemente ariloxi, aralquiloxi, ariloxialquilo, arilalquilo C_0-C_6 carboxi, $C(R^{110})=C(R^{110})$-COOH, oxo, =S, -Z, - Y'-Z, o -X- Y-Z, en donde cada R^Q está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^{80};

R^{500} es G^1, G^{21}, Q, o R^C; con la condición de que solo uno de R^{00}, R^{200}, y R^{500} sea G^1 y solo uno de R^{00}, N= y R^{500} sea G^{21};

G^{21} es -J^0-K^o, en donde J^0 y K^0 son independientemente arilo o heteroarilo, cada uno sustituido opcionalmente con uno a cuatro grupos R^K; cada R^K es independientemente hidrógeno, halógeno, $CR^{110}=CR^{110}COOR^{110}$, nitro, -Z, -Y-Z, o -X-Y-Z;

G^1 es -L^{10}- R, en donde L^{10} ·es un enlace, L^{50}, L^{60}, -L^{50}-L^{60}-L^{50}-, o -L^{60}-L^{50}-L^{50}-, en donde

cada L^{50} es independientemente -$[C(R^{150})_2]_m$-;

cada L^{60} es independientemente -CS-, -CO-, -SO_2-, -O-, -$CON(R^{110})$-, -$CONR^{110}N(R^{110})$-, - $C(=NR^{110})$-, -C(NOR^{11})-, -$C(=N\text{-}N(R^{110})_2)$-, -cicloalquilo C_3-C_8-, o -heterociclilo-, en donde el cicloalquilo o heterociclilo está sustituido opcionalmente con uno a 4 grupos R^{140}; o cada L^{60} es independientemente alidiilo C_2-C_6, en donde la cadena de alidiilo está interrumpida opcionalmente por -$C(R^{100})_2$-, -$C(R^{110})_2C(R^{110})_Z$-, -$C(R^{11})C(R^{110})$-, -$C(R^{110})_2O$-, -$C(R^{110})_ZNR^{110}$-, -C-, -O-, - S-, -N(RO)CO-, -$N(R^{100})CO_2$-, -$CON(R^{110})$-, -CO-, -CO_2-, -OC(=O)-, -OC(=O)$N(R^{100})$-, - SO_2-, -$N(R^{100})SO_2$-, o -$SO_2N(R^{100})$;

R es arilo, heterociclilo, heteroarilo o -cicloalquilo (C_3-C_6), en donde R está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^A, en donde cada R^A es independientemente halógeno, nitro, heterociclilo, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6,

cicloalquilo C_3-C_8, (cicloalquilo C_3-C_8)-alquilo C_1-C_6-, (cicloalquenilo C_3-C_8)-alquilo C_1-C_6-, (cicloalquilo C_3-C_8)-alquenilo C_1-C_6-, arilalquilo, ariloxi, arilalcoxi C_1-$_6$, haloalquilo C_1-C_6, SO_2R^{110}, OR^{110}, SR^{110}, N_3, SOR^{110}, COR^{110}, $SO_2N(R^{110})_2$, $SO_2NR^{110}COR^{110}$, C≡N, $C(O)OR^{110}$, $CON(R^{110})_2$, $-CON(R^{110})OR^{110}$, $OCON(R^{110})_2$, $-NR^{110}COR^{110}$, $NR^{110}CON(R^{110})_2$, $NR^{110}COOR^{110}$, $-C(=N\text{-}OH)R^{110}$, $-C(=S)N(R^{110})_2$, $-S(=O)N(R^{110})_2$, $-S(=O)O^{110}$, $-N(R^{110})S(=O)_2R^{110}$, $-C(=O)N(R^{110})N(R^{110})_2$, $-OC(=O)\text{-}R^{110}$, $-OC(=O)\text{-}OR^{110}$ o $N(R^{11})_2$, en donde cada R^A está sustituido opcionalmente con 1 a 4 grupos que son independientemente -halógeno, -alquilo C_1-C_6, ariloxi, alquilo C_0-$_6SO_2R^{110}$, alquilo C_0-$_6COOR^{110}$, alcoxi C_1-$_6$ arilo, haloalquilo C_1-C_6, $-SO_2R^{110}$, $-OR^{110}$, $-SR^{110}$, $-N_3$, $-SO_2R^{110}$, $-COR^{110}$, $-SO_2N(R^{110})_2$, $-SO_2NR^{110}COR^{110}$, -C≡N, $-C(O)OR^{110}$, $-CON(R^{110})_2$, $-CON(R^{110})OR^{110}$, $-OCON(R^{110})_2$, $-NR^{110}COR^{110}$, $-NR^{110}CON(R^{110})_2$, $-NR^{110}COOR^{110}$, o $-N(R^{110})_2$;

R^N es $-L^{31}\text{-}R^{60}$, en donde L^{31} es un enlace, $-X^3(CH_Z)_n\text{-}X^3\text{-}$, $-(CH_2)_m\text{-}X3\text{-}(CH_2)_n\text{-}$ o $-(CH_2)_{1+w}$, $-Y^3\text{-}(CH_2)_W$ -, en donde cada w es independientemente 0-5: y cada X^3 es independientemente un enlace, $-C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})_2C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})=C(R^{110})\text{-}$, -C≡C-, -CO-, -CS-, $-CONR^{100}\text{-}$, $-C(=N)(R^{100})\text{-}$, $-C(=N\text{-}OR^{110})\text{-}$, $-C[=N\text{-}N(R^{110})_2]$, $-CO_2\text{-}$, $-SO_2\text{-}$, o $-SO_2N(R^{110})\text{-}$; e

Y^3 es -O-, -S-, $-NR^{70}\text{-}$, $-N(R^{100})CO\text{-}$, $-N(R^{110})CO2\text{-}$, -OCO-, $-OC(=O)N(R^{100})\text{-}$, $-NR^{100}CONR^{100}\text{-}$, $-N(R^{110})SO_2\text{-}$, o $-NR^{100}CSNR^{100}\text{-}$;

o L^{31} es una cadena alidilo C_2-$_6$ en donde la cadena alidilo está interrumpida opcionalmente por $-C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})_2C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})=C(R^{110})\text{-}$, $-C(R^{110})_2O\text{-}$, $-C(R^{110})_2NR^{110}\text{-}$, -C≡C-, -O-, -S-, $-N(R^{100})CO\text{-}$, $-N(R^{100})CO_2\text{-}$, $-CON(R^{100})\text{-}$, -CO-, $-CO_2\text{-}$, $-OC(=O)\text{-}$, $-OC(=O)N(R^{110})\text{-}$, $-SO_2\text{-}$, $-N(R^{100})SO_2\text{-}$, o $-SO_2N(R^{100})$; y

R^{60} es alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, arilo, cicloalquilo C_3-C_8, heteroarilo, heterociclilo, -CN, $-C(=O)R^{110}$, $-C(=O)OR^{110}$, $-C(=O)N(R^{110})_2$, $-N(R^{110})_2$, $-SO_2R^{110}$, $-S(=O)_2N(R^{110})_2$, $-C(=O)N(R^{110})N(R^{110})_2$, o $-C(=O)N(R^{11})(OR^{110})$, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo, o heterociclilo está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^{60a}, en donde

cada R^{60a} es independientemente -Z, -Y'-Z, o-X-Y-Z;

cada R^C es independientemente $-L^{30}\text{-}R^{70}$, en donde

cada L^{30} es independientemente un enlace $o\text{-}(CH_2)_m\text{-}V^{10}\text{-}(CH_2)_n\text{-}$, en donde

V^{10} es $-C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})_2C(R^{110})_2$, $-C(R^{110})=C(R^{110})\text{-}$, $-C(R^{110})_2O\text{-}$, $-C(R^{110})_2NR^{110}\text{-}$, -C≡C-, -O-, -S-, $-NR^{10}\text{-}$, $-N(R^{100})CO\text{-}$, $-N(R^{100})CO2\text{-}$, -OCO-, -CO-, -CS-, $-CONR^{100}\text{-}$, $-C(=N\text{-}R^{110})\text{-}$, $-C(=N\text{-}OR^{110})\text{-}$, $-C[=N\text{-}N(R^{110})_2]$, $-CO_2\text{-}$, $-OC(=O)\text{-}$, $-OC(=O)N(R^{100})\text{-}$, $SO_2\text{-}$, $-N(R^{100})SO_2\text{-}$, $-SO_2N(R^{100})\text{-}$, $-NR^{100}CONR^{100}\text{-}$, $-NR^{100}CSNR^{100}\text{-}$, cicloalquilo C_3-C_6, o ciclohaloalquilo C_3-C_6; o cada L^{30} es independientemente alidiilo C_2-C_6, en donde la cadena alidiilo está interrumpida opcionalmente por $-C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})_2C(R^{110})_2\text{-}$, $-C(R^{110})C(R^{110})\text{-}$, $-C(R^{110})_2O\text{-}$, $-C(R^{110})_2NR^{110}\text{-}$, -C≡C-, -O-, - S-, $-N(R^{100})CO\text{-}$, $-N(R^{100})CO_2\text{-}$, $-NR^{110}\text{-}$, $-CON(R^{100})\text{-}$, -CO-, $-CO_2\text{-}$, $-O(C=O)\text{-}$, $-O(C=O)N(R^{100})\text{-}$, $-SO_2\text{-}$, $-N(R^{100})SO_2\text{-}$, o $-SO_2N(R^{100})\text{-}$;

cada R^{70} es independientemente hidrógeno, halógeno, nitro, arilo, heteroarilo, heterociclilo, -Z, -Y-Z, o-X-YZ,

en donde el arilo, heteroarilo, y heterociclilo, están cada uno sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^{70a} en donde cada R^{70a} es independientemente ariloxi, aralquiloxi, ariloxialquilo, arilalquil C_0-C_6 carboxi, $C(R^{110})=C(R^{110})COOH$, oxo, -Z, - Y'-Z, o -X-Y-Z, en donde cada R^{70a} está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^{80}, y en donde cada R^{80} es independientemente halógeno, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_8, haloalquilo C_1-$C_8(OR^{110})$, alquilo C_0-C_6OR^{110}, alquilo C_0-$C_6CON(R^{110})_2$, alquilo C_0-C_6COR^{110}, alquilo C_0-C_6COOR^{110}, o alquilo C_0-$C_6SO_2R^{110}$;

cada R^{100} es independientemente $-R^{110}$, $-C(=O)R^{110}$, $-CO_2R^{110}$, o $-SO_2R^{110}$;

cada R^{110} es independientemente -hidrógeno, -alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_1-C_6, -haloalquilo C_1-C_6, o $-N(R^{12})_2$, en donde cualquier R^{110} está sustituido opcionalmente con 1 a 4 radicales de R^{120};

cada R^{120} es independientemente halógeno, ciano, nitro, oxo, $-B(OR^{130})$, alquilo C_o-$C_6N(R^{13})_2$, haloalquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, (alquilo C_0-C_6)C=O(OR^{130}), alquilo C_0-C_6OR^{130}, alquilo C_0-C_6COR^{130}, alquilo C_0-$C_6SO_2R^{130}$, alquilo C_0-$C_6CON(R^{13})_2$, alquilo C_0-$C_6CONR^{130}OR^{130}$, alquilo C_0-$C_6SO_2N(R^{130})_2$, alquilo C_0-C_6SR^{130}, haloalquilo C_0-C_6OR^{130}, alquilo C_0-C_6CN, - alquilo C_0-$C_6N(R^{13})_2$, $-NR^{13}SO_2R^{13}$, u -Oalquilo C_0-$_6COOR^{130}$;

cada R^{130} es independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, o alquinilo C_2-C_6;

cada R^{140} es independientemente alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, halógeno, haloalquilo C_1-C_6, alquilo C_0-$C_6CON(R^{110})_o$, alquilo C_0-$C_6CONR^{110}R^{10}$, alquilo C_0-C_6OR^{110}, o alquilo C_0-C_6COOR^{110}; y

cada R^{150} es independientemente hidrógeno, halógeno, OR^{130}, alquilo(C_1- C_6) o haloalquilo(C_1- C_6), en donde

cada alquilo está sustituido opcionalmente con al menos un grupo que es cada uno independientemente halógeno, ciano, nitro, azido, OR^{130}, $C(O)R^{130}$, $C(O)OR^{13}C(O)N(R^{130})_2$, $N(R^{130})_2$, $N(R^{130})C(O)R^{130}$, $N(R^{130})S(O)_2R^{130}$, $-OC(O)OR^{130}$, $OC(O)N(R^{130})_2$, $N(R^{130})C(O)OR^{130}$, $N(R^{130})C(O)N(R^{130})$, SR^{130}, $S(O)R^{130}$, $S(O)_2R'$, o $S(O)_2N(R^{130})_2$; o dos R^{150} (unidos al mismo átomo o a átomos diferentes) pueden tomarse conjuntamente para formar un cicloalquilo C_3-C_6;

cada X es independientemente -O-, -S-, o $-N(R^{100})-$;

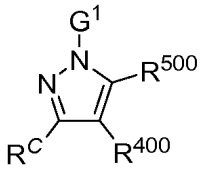
cada Y es independientemente $-[C(R^{150})_2]_p-$, o -alquenilo C_2-C_6, en donde p es 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

cada Y' es independientemente $-[C(R^{150})_2]_p-$, -alquenilo C_2-C_6 cicloalquilo C_3-C_8, o heterociclilo, en donde el cicloalquilo o heterociclilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos Z;

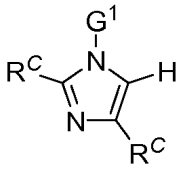
cada Z es independientemente -H, halógeno, $-OR^{110}$, $-SR^{110}$, $-C(=O)R^{110}$, $-C(=O)OR^{110}$, $-C(=O)N(R^{110})_2$, $-N(R^{100})_2$, $-N_3$, $-NO_2$, $-C(=N\text{-}OH)R^{110}$, $-C(=S)N(R^{110})_2$, -CN, $-S(=O)R^{110}$, $-S(=O)N(R^{110})_2$, $-S(=O)OR^{110}$, $-S(=O)_2R^{110}$, $S(=O)_2N(R^{110})_2$, $-NR^{110}COR^{110}$, $-N(R^{110})C(=O)N(R^{110})_2$, $-N(R^{110})COOR^{110}$, $-N(R^{110})S(=O)_2R^{110}$, $-C(=O)N(R^{110})N(R^{110})_2$, $-C(=O)N(R^{110})(OR^{110})$, $-OC(=O)\text{-}R^{110}$, $-OC(=O)\text{-}OR^{110}$, o $-OC(=O)\text{-}N(R^{110})_2$; y

cada m y n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula IV tiene una estructura de Fórmula V o VI:

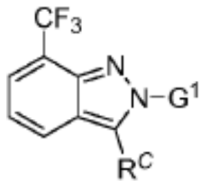


Fórmula V



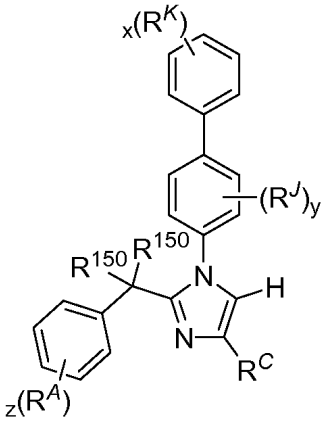
Fórmula VI

En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula VII:



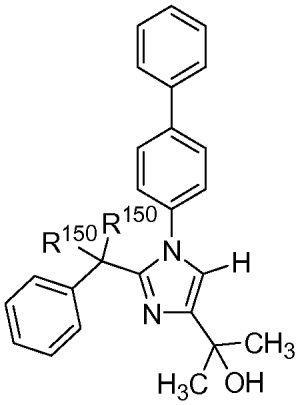
Fórmula VII

En otras realizaciones más, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula VIII:



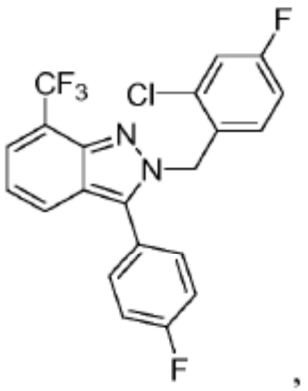
Fórmula VIII

En más realizaciones adicionales, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula IX:

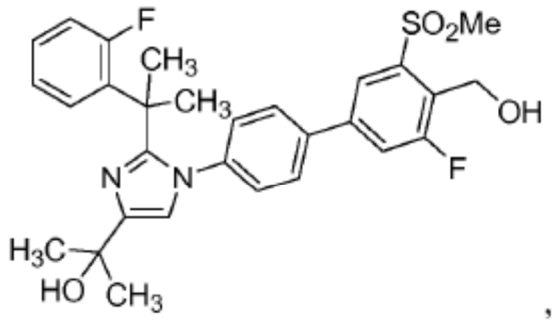


Fórmula IX

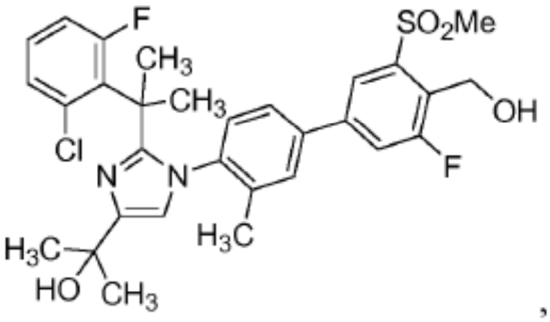
De acuerdo con esto, los compuestos de Fórmula IV que pueden ser útiles en los métodos de la invención incluyen, pero no están limitados a, los compuestos que tienen las estructuras mostradas a continuación, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



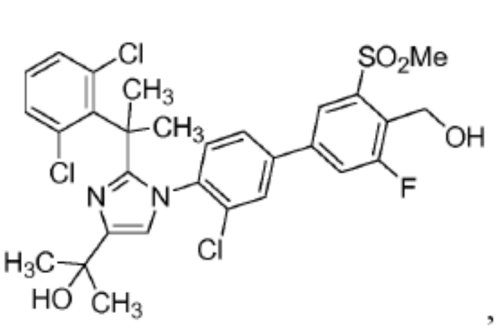
3



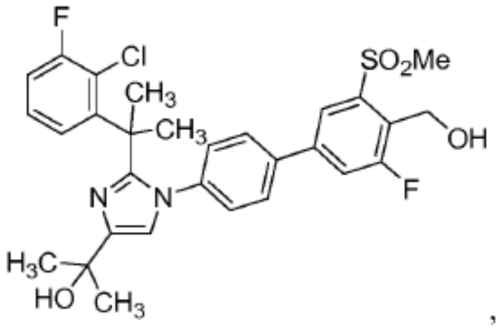
4



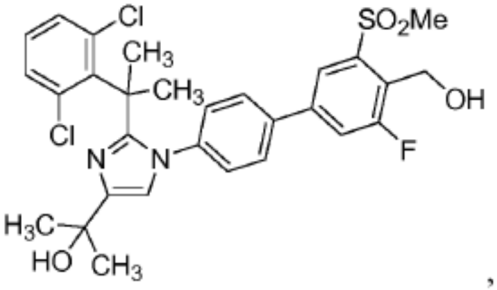
5



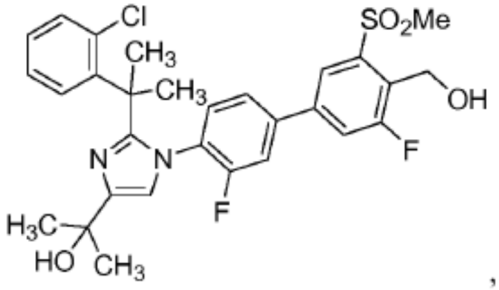
6



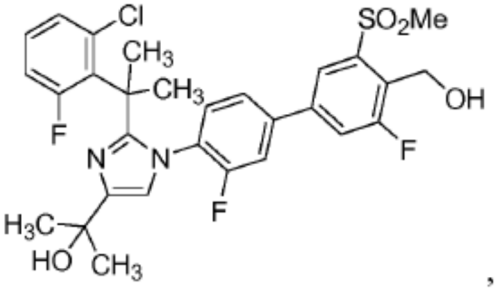
7



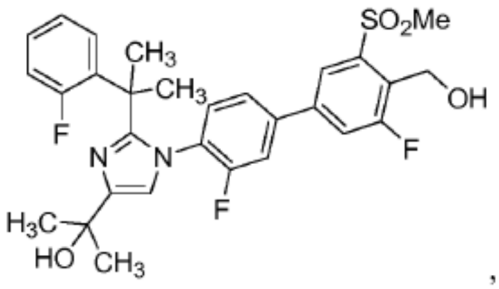
8



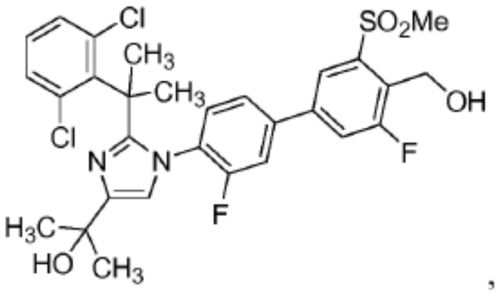
9



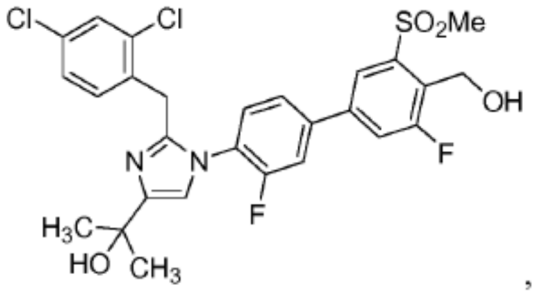
10



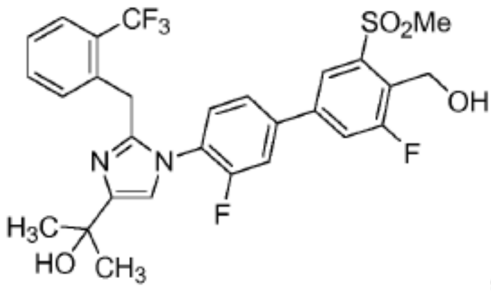
11

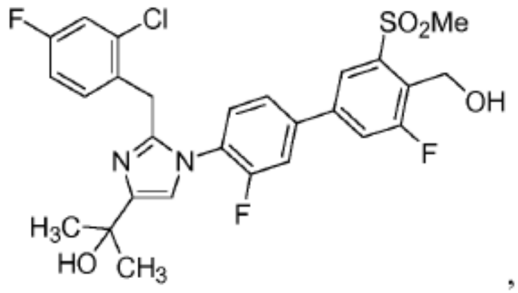


12

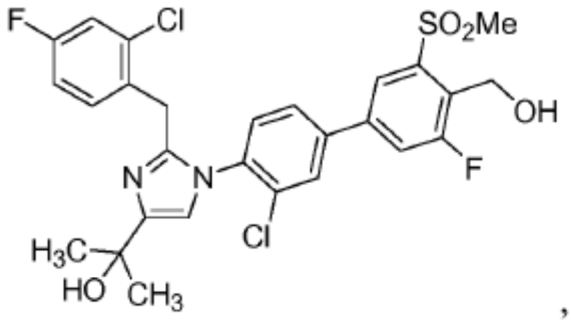


13



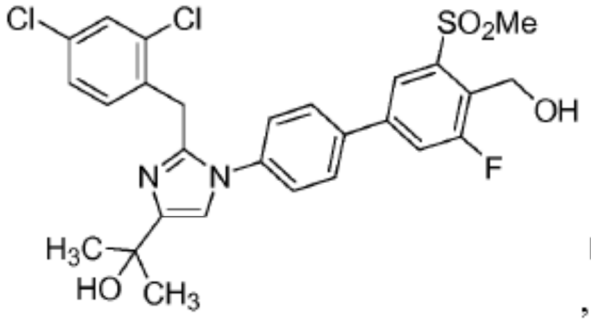


14

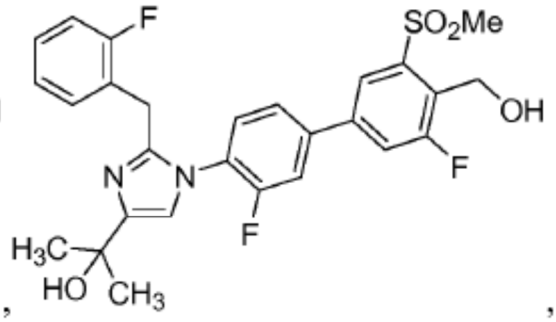


15

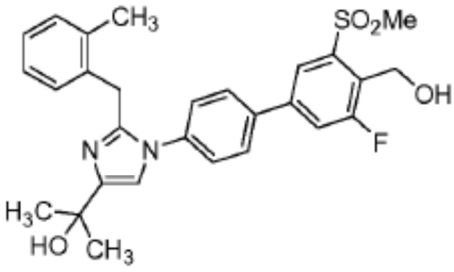
16



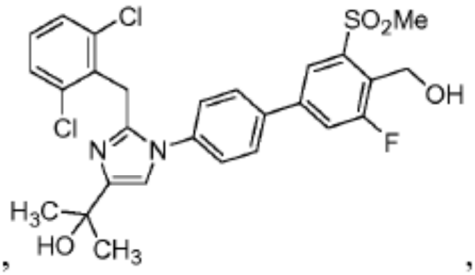
17



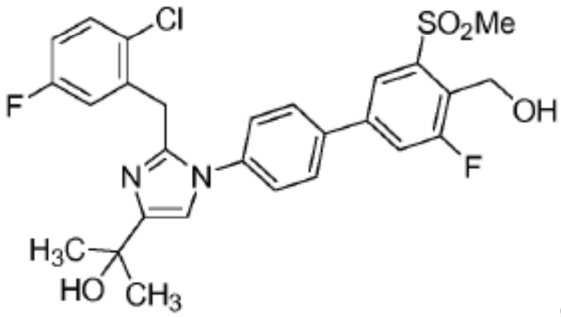
18



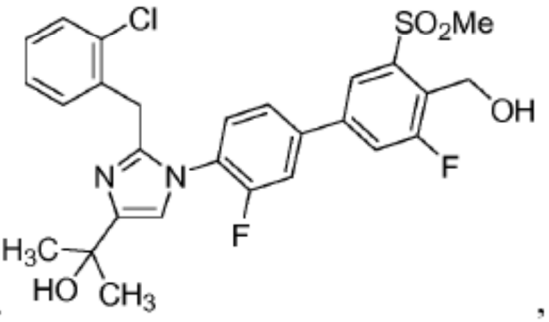
19



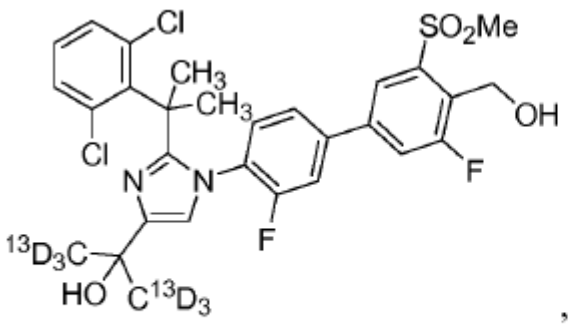
20



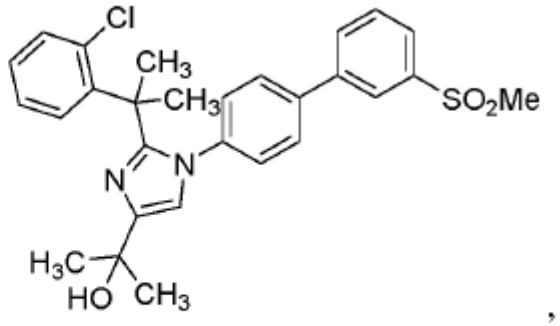
21



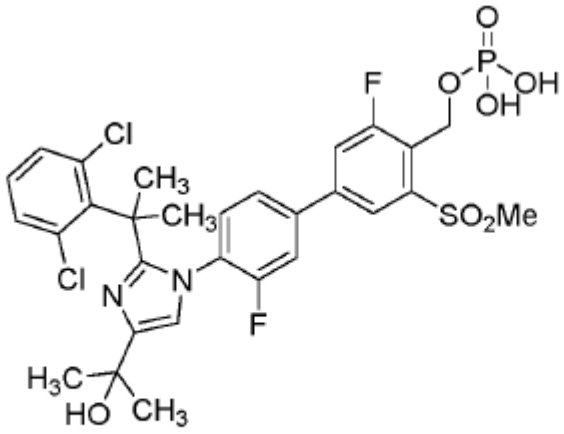
22



23



38



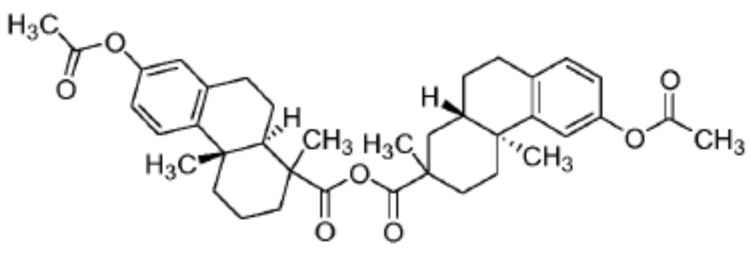
39

seleccionado de la lista que comprende:

33 2-(1-(3cloro-3'-fluoro-4'-(hidroximetil)-5'-(metilsulfonil)bifenil-4-il)-2-(2-(2,6diclorofenil) propan-2-il)-1H-imidazol-4-il)propan-2-ol; **34** 2-(2-(2(2-cloro-3-fluorofenil)propan-2-il)-1-(3'-fiuoro-4'-(hidroximetil)-5'(metilsulfonil)bifenil-4-il)-1H-imidazol-4-il)propan-2-ol; **35** 2-(2-(2(2,6-diclorofenil)propan-2-il)-1-(3'-fluoro-4'-(hidroximetil)-5'(metilsulfonil)bifenil-4-il)-1H-imidazol-4-il)propan-2-ol; **36** 2-(2-(2(2,6-diclorofenil)propan-2-il)-1-(3,3'-difluoro-4'-(hidroximetil)-5'(metilsulfonil)bifenil-4-il)-1H-imidazol-4-il)propan-2-ol; y **37** 2-(2-[1(2,6-diclorofenil)etil]-1-[3,3'-difluoro-4'-(hidroximetil)-5'(metilsulfonil)bifenil-4-il]-1H-imidazol-4-il)propan-2-ol. El compuesto **12** también se conoce como WO2010 0138598 Ej. 9. El compuesto **38** también se conoce como WO2007 002563 Ej. 19. El compuesto **39** también se conoce como WO2012 0135082.

Los compuestos de Fórmula IV pueden sintetizarse como se describe en la publicación PCT No. US2010/0069367 y WO2010/138598.

El agonista de LXR que puede usarse para el tratamiento y/o prevención de metástasis puede ser el compuesto 24, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



24

En realizaciones adicionales, los compuestos que pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de metástasis pueden encontrarse en las publicaciones PCT de la lista que consiste en:

WO2006/094034, WO2008/049047, WO2009/020683, WO2009/086138, WO2009/086123, WO2009/086130, WO2009/086129, WO2007/002559, WO2007/002563, WO2007/081335, WO2006/017055, WO2006/102067, WO2009/024550, US2006/0074115, US2006/0135601, WO2009/021868, WO2009/040289, WO2007/047991, WO2007/050425, WO2006/073363, WO2006/073364, WO2006/073365, WO2006/073366, WO2006/073367, US2009/0030082, WO2008/065754, JP2008/179562, WO2007/092065, US2010/0069367, US7998995, US7247748, WO2010/138598, US7365085, US75776215, US63136503, US2004/0072868, US2005/0107444, US2005/0113580, US2005/0131014, US2005/0282908, US2009/0286780.

LXRα y *LXRβ*, descubiertos inicialmente por múltiples grupos aproximadamente al mismo tiempo (Apfel et al, 1994; Willy et al, 1995; Song et al, 1994; Shinar et al, 1994; Teboul et al, 1995), pertenecen a una familia de receptores hormonales nucleares que se activan endógenamente por el colesterol y sus derivados oxidados para mediar la transcripción de genes implicados en el mantenimiento del metabolismo de la glucosa, colesterol, y ácidos grasos (Janowski *et al.*, 1996; Calkin y Tontonoz, 2012). Dado el vínculo intrincado entre el metabolismo de los lípidos y el crecimiento de las células cancerosas (Cairns *et al.*, 2011), no es probable que la expresión ubicua de *LXRβ* en el melanoma sea coincidente, permitiendo a las células de melanoma sintetizar partículas de lípidos y lipoproteínas para sostener su crecimiento. Al mismo tiempo, sin embargo, dichos niveles estables de expresión basal hacen de *LXRβ* una diana terapéutica ideal, como se ejemplifica por la capacidad de respuesta de amplio rango de las células de melanoma a la terapia de activación de LXRβ.

Se ha mostrado que los compuestos tienen selectividad para LXRβ o LXRα. Esta selectividad puede permitir una actividad incrementada y/o disminuida de los efectos en la diana. Los ejemplos de compuestos con selectividad hacia LXRβ o LXRα se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de CE_{50} para compuestos seleccionados frente a LXRα y LXRβ

Compuesto	CE_{50} – LXRα (nM)	CE_{50} – LXRβ (nM)
GW3965 **2**	200	40
SB742881 **25**	74	25
TO901317 **1**	20	50
LXR-623 **3**	179	24
12	<100	11
38	101-1000	630

Tal y como se usa en la presente memoria, la referencia a la actividad de un agonista de LXR en LXRα y LXRβ se refiere a la actividad como se mide usando el ensayo de detección de ligando (LiSA) descrito en Spencer *et al.* Journal of Medicinal Chemistry 2001, 44, 886-897. En algunas realizaciones, el agonista de LXR tiene una CE50 de menos de 1μM en el ensayo de detección de ligando (p. ej., 0,5 nm a 500 nM, 10 nM a 100 nM). Por ejemplo, los métodos de la invención pueden realizarse usando un agonista de LXRβ que tiene actividad para LXRβ que es al menos 3 veces mayor que la actividad del agonista para LXRα, o que tiene actividad para LXRβ que es al menos 10 veces mayor que la actividad del agonista para LXRα, o que tiene actividad para LXRβ que es al menos 100 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXRα, o que tiene actividad para LXRβ que es al menos 3 veces la actividad del agonista para LXRα. El término “mayor actividad” en el ensayo LiSA se refiere a una menor CE_{50}. Por ejemplo, GW3965 **2** tiene una actividad aproximadamente 6 veces mayor para LXRβ (CE_{50}= 30) comparado con LXRα (CE_{50}= 190).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “incrementa el nivel de la expresión de ApoE *in vitro*” se refiere a determinados agonistas de LXR capaces de incrementar el nivel de la expresión de ApoE 2,5 veces en el ensayo de qPCR del Ejemplo 21 a una concentración de menos de 5μM (p. ej., a una concentración de 100 nM a 2 μM, a una concentración de menos de o igual a 1μM). Los agonistas de LXR que presentan este efecto *in vitro* pueden ser altamente eficaces para su uso en los métodos de la invención.

El término “alquilo”, usado en la presente solicitud, se refiere a un sustituyente univalente alifático saturado ramificado o no ramificado. El sustituyente alquilo tiene 1 a 100 átomos de carbono, (p. ej., 1 a 22 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono 1 a 6 átomos de carbono, 1 a 3 átomos de carbono). De acuerdo con esto, los ejemplos del sustituyente alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo y *n*-hexilo.

El término “alcoxi” representa un sustituyente químico de fórmula -OR, donde R es un grupo alquilo C1-C6 sustituido opcionalmente, a no ser que se especifique otra cosa. En algunas realizaciones, el grupo alquilo puede estar sustituido, p. ej., el grupo alcoxi puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos sustituyentes como se define en la presente memoria.

El término “alcoxialquilo” representa un grupo heteroalquilo, como se define en la presente memoria, que se describe como un grupo alquilo que está sustituido con un grupo alcoxi. Los grupos alcoxialquilo no sustituidos ejemplares incluyen entre 2 a 12 carbonos. En algunas realizaciones, el alquilo y el alcoxi pueden estar cada uno sustituidos además con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente memoria para el grupo respectivo.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “cicloalquilo” se refiere a un sustituyente monocíclico, bicíclico, o tricíclico, que puede ser saturado o parcialmente saturado, es decir, poseer uno o más dobles enlaces. Los sustituyentes monocíclicos se ejemplifican por un grupo hidrocarburo cíclico saturado que contiene de 3 a 8 átomos de carbono. Los ejemplos de sustituyentes cicloalquilo monocíclico incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los sustituyentes cicloalquilo bicíclicos fusionados se ejemplifican por un anillo cicloalquilo fusionado con otro anillo cicloalquilo. Los ejemplos de sustituyentes cicloalquilo bicíclicos incluyen, pero no están limitados a, decalina, 1,2,3,7,8,8a-hexahidro-naftaleno, y semejantes. Los sustituyentes cicloalquilo tricíclicos se ejemplifican por un anillo cicloalquilo bicíclico fusionado con un sustituyente cicloalquilo adicional.

El término “alquileno”, usado en la presente solicitud, se refiere a un sustituyente bivalente alifático saturado ramificado o no ramificado (p. ej., el sustituyente alquileno tiene 1 a 6 átomos de carbono, 1 a 3 átomos de carbono). De acuerdo con esto, los ejemplos del sustituyente alquileno incluyen metileno, etileno, trimetileno, propileno, tetrametileno, isopropilideno, pentametileno y hexametileno.

El término “alquenileno o alquenilo”, tal y como se usa en la presente solicitud, es un sustituyente bivalente alifático insaturado ramificado o no ramificado que tiene un doble enlace entre dos átomos de carbono adyacentes (p. ej., el sustituyente alquenileno tiene 2 a 6 átomos de carbono, 2 a 4 átomos de carbono). De acuerdo con esto, los ejemplos del sustituyente alquenileno incluyen, pero no están limitados a, vinileno, 1-propenileno, 2-propenileno, metilvinileno, 1-butenileno, 2-butenileno, 3-butenileno, 2-metil-1-propenileno, 2-metil-2-propenileno, 2- pentenileno, 2-hexenileno.

El término “alquinileno o alquinilo”, tal y como se usa en la presente solicitud, es un sustituyente bivalente alifático insaturado ramificado o no ramificado que tiene un triple enlace entre dos átomos de carbono adyacentes (p. ej., el sustituyente alquinileno tiene 2 a 6 átomos de carbono 2 a 4 átomos de carbono). Los ejemplos del sustituyente alquinileno incluyen, pero no están limitados a, etinileno, 1-propinileno, 1-butinileno, 2-butinileno, 1-pentinileno, 2-pentinileno, 3-pentinileno y 2-hexinileno.

El término “alcadienileno”, tal y como se usa en la presente solicitud, es un sustituyente bivalente alifático insaturado ramificado o no ramificado que tiene dos dobles enlaces entre dos átomos de carbono adyacentes (p. ej., el sustituyente alcadienileno tiene 4 a 10 átomos de carbono). De acuerdo con esto, los ejemplos del sustituyente alcadienileno incluyen, pero no están limitados a, los sustituyentes 2,4-pentadienileno, 2,4-hexadienileno, 4-metil-2,4-pentadienileno, 2,4-heptadienileno, 2,6-heptadienileno, 3-metil-2,4-hexadienileno, 2,6-octadienileno, 3-metil-2,6-heptadienileno, 2-metil-2,4-heptadienileno, 2,8-nonadienileno, 3-metil-2,6-octadienileno, 2,6-decadienileno, 2,9-decadienileno y 3,7-dimetil-2,6-octadienileno.

El término “sustituyente heteroalifático o heteroalquilo”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un sustituyente monovalente o bivalente, en el que uno o más átomos de carbono han sido sustituidos con un heteroátomo, por ejemplo, con un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, en donde los átomos de nitrógeno y de azufre pueden estar oxidados opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado opcionalmente. El o los heteroátomos de O, N y S pueden estar localizados en cualquier posición interior del sustituyente heteroalifático. Los ejemplos incluyen $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Un sustituyente heteroalifático puede ser lineal o ramificado, y saturado o insaturado.

En una realización, el sustituyente heteroalifático tiene 1 a 100, (p. ej., 1 a 42 átomos de carbono). En otra realización más, el sustituyente heteroalifático es un residuo de polietilen glicol.

Tal y como se usa en la presente memoria, “sustituyente aromático o arilo” se pretende que signifique cualquier anillo carbonado estable monocíclico, bicíclico o policíclico de hasta 10 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático, y puede no estar sustituido o estar sustituido. Los ejemplos de dichos sustituyentes aromáticos incluyen fenilo, *p*-toluenilo (4-metilfenilo), naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo. En los casos en los que el sustituyente aromático es bicíclico y un anillo no es aromático, se entiende que la unión es a través del anillo aromático.

El término “sustituyentes alquilarilo o arilalquilo” se refiere a sustituyentes alquilo como se ha descrito anteriormente en donde uno o más enlaces con hidrógeno contenidos en ellos se reemplazan por un enlace con un sustituyente arilo como se ha descrito anteriormente. Se entiende que un sustituyente arilalquilo está conectado al grupo carbonilo si el

compuesto de la invención a través de un enlace del sustituyente alquilo. Los ejemplos de sustituyentes arilalquilo incluyen, pero no están limitados a, bencilo (fenilmetilo), *p*-trifluorometilbencilo (4-trifluorometilfenilmetilo), 1-feniletilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, 2-fenilpropilo y semejantes.

El término “sustituyente heteroaromático o heteroarilo”, tal y como se usa en la presente memoria, representa un anillo estable monocíclico, bicíclico o policíclico de hasta 10 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático y contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Los sustituyentes heteroaromáticos bicíclicos incluyen anillos fenilo, piridina, pirimidina o piridizina que están

a) fusionados con un anillo heterocíclico aromático de 6 miembros (insaturado) que tiene un átomo de nitrógeno;

b) fusionados con un anillo heterocíclico aromático de 5 o 6 miembros (insaturado) que tiene dos átomos de nitrógeno;

c) fusionados con un anillo heterocíclico aromático de 5 miembros (insaturado) que tiene un átomo de nitrógeno junto con un átomo de oxígeno o un átomo de azufre; o

d) fusionados con un anillo heterocíclico aromático de 5 miembros (insaturado) que tiene un heteroátomo seleccionado de O, N o S.

Los grupos heteroarilo en el alcance de esta definición incluyen, pero no están limitados a: benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, furanilo, indolinilo, indolilo, indolazinilo, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftpiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolina, isoxazolina, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidinilo, aziridinilo, 1,4-dioxanilo, hexahidroazepinilo, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidinilo, metilendioxibenzoilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, acridinilo, carbazolilo, cinolinilo, quinoxalinilo, pirrazolilo, indolilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isoxazolilo, indolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo, tetrahidroquinolina. En los casos en los que el sustituyente heteroarilo es bicíclico y un anillo no es aromático o no contiene heteroátomos, se entiende que la unión es a través del anillo aromático o a través del anillo que contiene el heteroátomo, respectivamente. Si el heteroarilo contiene átomos de nitrógeno, se entiende que los *N*-óxidos correspondientes del mismo también están englobados por esta definición.

Los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, aromáticos y heteroaromáticos pueden estar sustituidos opcionalmente una o más veces, de la misma manera o de manera diferente con uno cualquiera o más de los siguientes sustituyentes incluyendo, pero no limitado a: sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, aromáticos y heteroaromáticos, arilo, heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; $-NO_2$; -CN; $-CF_3$; - CH_2CF_3; $-CHCl_2$; $-CH_2OH$; $-CH_2CH_2OH$; $-CH_2NH_2$; $-CH_2SO_2CH_3$; $-C(O)R_x$; $-CO_2(R_x)$; - $CON(R_x)_2$; $-OC(O)R_x$; $-OCO_2R_x$; $-OCON(R_x)_2$; $-N(R_X)_2$; $-S(O)R_x$; $-S(O)_2R_x$; $-NR_x(CO)R_x$ en donde cada aparición de R_x independientemente incluye, pero no está limitado a, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en la presente memoria pueden estar sustituidos o no sustituidos, ser ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en donde cualquiera de los sustituyentes aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, (alquil)arilo o (alquil)heteroarilo descritos anteriormente y en la presente memoria pueden estar sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará que cualesquiera dos sustituyentes adyacentes tomados conjuntamente pueden representar un sustituyente alicíclico o heterocíclico de 4, 5, 6, o 7 miembros sustituido o no sustituido. Los ejemplos adicionales de sustituyentes aplicables generalmente se ilustran por las realizaciones específicas mostradas a continuación.

Los términos “halo” y “halógeno” se refieren a un átomo de halógeno seleccionado del grupo que consiste en F, Cl, Br e I.

El término “sustituyente alquilo halogenado, haloalquilo” se refiere a un sustituyente alquilo como se ha definido anteriormente que está sustituido con al menos un átomo de halógeno. En una realización, el sustituyente alquilo halogenado está perhalogenado. En otra realización, perfluoroalquilo se refiere a que el sustituyente alquilo halogenado es un sustituyente perfluorado univalente de fórmula C_nF_{2n+1}. Por ejemplo, el sustituyente alquilo halogenado puede tener 1 a 6 átomos de carbono, (p. ej., 1 a 3 átomos de carbono). De acuerdo con esto, los ejemplos del grupo alquilo incluyen trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, *n*-perfluoropropilo, *n*-perfluorobutilo y *n*-perfluoropentilo.

El término “amino”, tal y como se usa en la presente memoria, representa $-N(R^{N1})_2$, en donde cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO_2, $N(R^{N2})_2$, SO_2OR^{N2}, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de *N*, alquilo, alquenilo,

alquinilo, alcoxi, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, alquilcloalquilo, heterociclilo (p. ej., heteroarilo), alquilheterociclilo (p. ej., alquilheteroarilo), o dos R^{N1} se combinan para formar un heterociclilo o un grupo protector de *N*, y en donde cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo, o arilo. En una realización preferida, amino es $-NH_2$, o $-NHR^{N1}$, en donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO_2, NH_2, NR^{N2}_2, SO_2OR^{N2}, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo, o arilo, y cada R^{N2} puede ser H, alquilo, o arilo. El término "aminoalquilo", tal y como se usa en la presente memoria, representa un grupo heteroalquilo, como se define en la presente memoria, que se describe como un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, sustituido con un grupo amino, como se define en la presente memoria. El alquilo y amino pueden estar sustituidos además cada uno con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente memoria para el grupo respectivo. Por ejemplo, el resto alquilo puede comprender un sustituyente oxo (=O).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ariloxi" se refiere a sistemas aromáticos o heteroaromáticos que están acoplados a otro residuo a través de un átomo de oxígeno. Un ejemplo típico de un O-arilo es fenoxi. De forma similar, "arilalquilo" se refiere a sistemas aromáticos y heteroaromáticos que están acoplados a otro residuo a través de una cadena de carbono, saturada o insaturada, típicamente C1-C8, C1-C6, o más particularmente C1-C4 o C1-C3 cuando está saturada o C2-C8, C2-C6, C2-C4, o C2-C3 cuando está insaturada, incluyendo las heteroformas de la misma. Para mayor claridad, arilalquilo incluye así un grupo arilo o heteroarilo como se ha definido anteriormente conectado a un resto alquilo, heteroalquilo, alquenilo, heteroalquenilo, alquinilo o heteroalquinilo también como se ha definido anteriormente. Los arilalquilos típicos serían un aril(C6-C12)alquilo(C1-C8), aril(C6- C12)alquenilo(C2-C8), o aril(C6-C12)alquinilo(C2-C8), más las heteroformas. Un ejemplo típico es fenilmetilo, referido comúnmente como bencilo.

Los sustituyentes opcionales típicos en grupos aromáticos o heteroaromáticos incluyen independientemente halo, CN, NO_2, CF_3, OCF_3, COOR', $CONR'_2$, OR', SR', SOR', SO_2R', NR'_2, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', $NR'C(O)NR'_2$, $NR'SO_2NR'_2$, o $NR'SO_2R'$, en donde cada R' es independientemente H o un grupo sustituido opcionalmente seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo, y arilo (todos como se han definido anteriormente); o el sustituyente puede ser un grupo sustituido opcionalmente seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, arilo, heteroarilo, O-arilo, O- heteroarilo y arilalquilo.

Los sustituyentes opcionales en un grupo no aromático (p. ej., grupos alquilo, alquenilo, y alquinilo), se seleccionan típicamente de la misma lista de sustituyentes adecuados para los grupos aromáticos o heteroaromáticos, excepto como se indica de otra manera en la presente memoria. Un grupo no aromático también puede incluir un sustituyente seleccionado de =O y =NOR' donde R' es H o un grupo sustituido opcionalmente seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo, y arilo (todos como se han definido anteriormente).

En general, un grupo sustituyente (p. ej., alquilo, alquenilo, alquinilo, o arilo (incluyendo todas las heteroformas definidas anteriormente) puede en sí mismo estar sustituido opcionalmente con sustituyentes adicionales. La naturaleza de estos sustituyentes es similar a los indicados respecto a los sustituyentes en las estructuras básicas anteriormente. Así, cuando una realización de un sustituyente es alquilo, este alquilo puede estar sustituido opcionalmente con los sustituyentes restantes indicados como sustituyentes cuando esto tenga sentido químico, y cuando esto no disminuya el límite de tamaño del alquilo per se; p. ej., un alquilo sustituido con alquilo o con alquenilo extendería simplemente el límite superior de los átomos de carbono para estas realizaciones, y no se incluye. Sin embargo, un alquilo sustituido con arilo, amino, halo y semejantes estaría incluido. Por ejemplo, cuando un grupo está sustituido, el grupo puede estar sustituido con 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sustituyentes. Los sustituyentes opcionales incluyen, pero no están limitados a: alquilo C1-C6 o heteroarilo, alquenilo C2-C6 o heteroalquenilo, alquinilo C2-C6 o heteroalquinilo, halógeno; arilo, heteroarilo, azido($-N_3$), nitro ($-NO_2$), ciano (-CN), aciloxi(-OC(=O)R'), acilo (-C(=O)R'), alcoxi (-OR'), amido (-NR'C(=O)R" o - C(=O)NRR'), amino (-NRR'), ácido carboxílico ($-CO_2H$), éster carboxílico ($-CO_2R'$), carbamoilo (-OC(=O)NR'R" o -NRC(=O)OR'), hidroxi (-OH), isociano (-NC), sulfonato ($-S(=O)_2OR$), sulfonamida ($-S(=O)_2NRR'$ o $-NRS(=O)_2R'$), o sulfonilo ($-S(=O)_2R$), donde cada R o R' se selecciona, independientemente, de H, alquilo C1-C6 o heteroarilo, alquenilo C2-C6 o heteroalquenilo, alquinilo 2C-6C o heteroalquinilo, arilo, o heteroarilo. Un grupo sustituido puede tener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 sustituyentes.

El término "heterociclilo, heterocíclico, o Het", tal y como se usa en la presente memoria, representa heteroalquilo o heteroalquenilo cíclico que es un anillo de, p. ej., 3, 4, 5, 6 o 7 miembros, a no ser que se especifique otra cosa, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, y azufre. El anillo de 5 miembros tiene cero a dos dobles enlaces, y los anillos de 6 y 7 miembros tienen cero a tres dobles enlaces. El término "heterociclilo" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica con puente en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos hace de puente de dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, p. ej., un grupo quinuclidinilo. El término "heterociclilo" incluye grupos bicíclicos, tricíclicos, y tetracíclicos en los que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está fusionado con uno, dos, o tres anillos carbocíclicos, p. ej., un anillo arilo, un anillo ciclohexano, un anillo ciclohexeno, un anillo ciclopentano, un anillo ciclopenteno, u otro anillo monocíclico heterocíclico, tal como indolilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrahidroquinolilo, benzofurilo, benzotienilo y semejantes.

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden comprender uno o más centros estereogénicos, y así pueden existir en varias formas isoméricas, p. ej., estereoisómeros y/o diastereómeros. Así, los compuestos de la

invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden estar en la forma de un enantiómero, diastereómero o isómero geométrico individual, o pueden estar en la forma de una mezcla de estereoisómeros. En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención son compuestos enantiopuros. En determinadas otras realizaciones, se proporcionan mezclas de estereoisómeros o diastereómeros. Además, cuando los compuestos de la invención existen en formas tautoméricas, cada tautómero está englobado en la presente memoria.

Además, determinados compuestos, como se describe en la presente memoria, pueden tener uno o más dobles enlaces que pueden existir bien como el isómero *Z* o *E*, a no ser que se indique otra cosa. La invención engloba adicionalmente los compuestos como isómeros individuales que carecen sustancialmente de otros isómeros y alternativamente, como mezclas de varios isómeros, p. ej., mezclas racémicas de estereoisómeros. Además de los compuestos mencionados anteriormente *per se*, esta invención también engloba derivados farmacéuticamente aceptables de estos compuestos y composiciones que comprenden uno o más compuestos de la invención y uno o más excipientes o aditivos farmacéuticamente aceptables.

Métodos de tratamiento

Como se describe en la presente memoria, miR-1908, miR-199a-3p, miR-199a-5p, y CTGF se identificaron como promotores endógenos de metástasis de la invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización en melanoma mientras DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, LXR, y miR7 funcionan como supresores o inhibidores de la metástasis del mismo proceso. Además, se encontró que estos miARN toman como diana de forma convergente a ApoE y el factor de choque térmico DNAJA4. La ApoE secretada por el cáncer suprime la invasión y el reclutamiento endotelial mediante la activación de los receptores LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales, respectivamente. DNAJA4, a su vez, induce la expresión de ApoE. Estos miARN predicen fuertemente los resultados metastásicos humanos. El pretratamiento con ácidos nucleicos bloqueantes (LNA) dirigidos a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 inhibe la metástasis a múltiples órganos, mientras la administración terapéutica de estos LNA suprime significativamente las metástasis de células de melanoma humanas en un modelo de ratón.

De acuerdo con esto, esta invención proporciona métodos para tratar el melanoma mediante el incremento en el sujeto del nivel de expresión o del nivel de actividad de uno de los supresores de la metástasis. Este incremento puede conseguirse, entre otros, mediante la expresión forzada de uno o más supresores de la metástasis DNAJA4, ApoE, LRP1, y LRP8, o disminuyendo el nivel de expresión o el nivel de actividad de uno o más de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908. Además, el tratamiento puede conseguirse disminuyendo el nivel de expresión o el nivel de actividad de uno o más de los promotores de la metástasis.

La invención también proporciona métodos para tratar en un sujeto un trastorno angiogénico o un trastorno de angiogénesis. Los términos “trastorno angiogénico”, “trastorno de angiogénesis”, y “trastorno de angiogénesis” se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica. Un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica se refiere a un trastorno donde la angiogénesis anormal o aberrante, sola o en combinación con otros, contribuye a la causalidad, origen, o síntoma del trastorno. Los ejemplos de este trastorno incluyen varios cánceres (p. ej., tumores vascularizados), trastornos oculares, trastornos inflamatorios, y otros.

Los tumores vascularizados típicos que pueden tratarse con el método incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren un componente vascular para el suministro de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, carcinomas del pulmón, mama, hueso, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, sarcoma de Kaposi, y sarcomas.

Varios trastornos o afecciones, aparte del cáncer, también pueden tratarse con el método descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Grave, restenosis vascular (incluyendo restenosis después de angioplastia), malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, glaucoma neovascular, enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, enfermedad renal poliquística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, hepatitis autoinmune, enfermedad hepática inflamatoria crónica, cirrosis hepática, linfoma de células T cutáneo, rosácea, y carcinoma de células basales.

Otras dianas del tratamiento incluyen las descritas, p. ej., en las Solicitudes de EE.UU. 2009004297, 20090175791, y 20070161553, tales como angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto corneal, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, fibroplasia retrolental de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, varias otras enfermedades y trastornos inflamatorios, y endometriosis.

Expresión forzada de supresores de la metástasis

Tanto los polipéptidos de los supresores de la metástasis mencionados anteriormente (p. ej., DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, y LXR) como el ácido nucleico que codifica los polipéptidos pueden usarse para llevar a la práctica la invención. Aunque pueden usarse muchas preparaciones de polipéptidos, se prefiere un polipéptido altamente purificado o aislado. Los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan en la presente memoria indistintamente para describir la organización de residuos de aminoácidos en un polímero. Un péptido, polipéptido, o proteína puede estar compuesto por los 20 aminoácidos naturales estándar, además de aminoácidos raros y análogos de aminoácidos sintéticos. Pueden ser cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación posterior a la traducción (p. ej., glicosilación o fosforilación).

El polipéptido "de esta invención" incluye versiones de fusión o quiméricas producidas recombinantemente o sintéticamente de cualquiera de los supresores de la metástasis mencionados anteriormente, que tienen los dominios o partes particulares que están implicados en la red. El término también engloba polipéptidos que tienen una metionina amino-terminal añadida (útil para la expresión en células procariotas).

Dentro del alcance de esta invención están proteínas de fusión que contienen una o más de las secuencias mencionadas anteriormente y una secuencia heteróloga. Una "quimera" o "fusión" se refiere a la combinación de secuencias de aminoácidos de diferente origen en una cadena de polipéptido por la combinación en marco de sus secuencias de nucleótidos codificadoras. El término engloba explícitamente fusiones internas, es decir, la inserción de secuencias de diferente origen en una cadena de polipéptido, además de la fusión a uno de sus extremos. Un polipéptido, ácido nucleico, o gen heterólogo es uno que se origina a partir de una especie extraña, o, si es a partir de la misma especie, se modifica sustancialmente respecto a su forma original. Dos dominios o secuencias fusionados son heterólogos entre sí si no están adyacentes entre sí en una proteína o ácido nucleico natural.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" se refiere a un polipéptido que se ha separado de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con los que está asociado naturalmente. El polipéptido puede constituir al menos el 10% (es decir, cualquier porcentaje entre el 10% y el 100%, p. ej., el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80%, 85%, 90%, 95%, y 99%) en peso seco de la preparación purificada. La pureza puede medirse por cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, por análisis de cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o HPLC. Un polipéptido aislado descrito en la invención puede purificarse a partir de una fuente natural, producirse por técnicas de ADN recombinante, o por métodos químicos.

Un polipéptido "recombinante" se refiere a un polipéptido producido por técnicas de ADN recombinante; es decir, producido a partir de células transformadas con una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido deseado. Un polipéptido "sintético" se refiere a un polipéptido preparado por síntesis química. El término "recombinante" cuando se usa en referencia, p. ej., a una célula, ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula deriva de una célula modificada de esta manera.

"Sobreexpresión" se refiere a la expresión de un ARN o polipéptido codificado por un ácido nucleico introducido en una célula huésped, en donde el ARN o polipéptido o proteína no está normalmente presente en la célula huésped, o en donde el ARN o polipéptido está presente en dicha célula huésped a un nivel mayor que el normalmente expresado a partir del gen endógeno que codifica el ARN o polipéptido.

La composición de aminoácidos de cada uno de los polipéptidos mencionados anteriormente puede variar sin alterar sus funciones - la capacidad de regular al alza la red mencionada anteriormente (p. ej., incrementar el nivel de activación de la ruta de señalización de ApoE/LRP), inhibiendo de esta manera la metástasis a múltiples órganos. Por ejemplo, puede contener una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación β (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en uno de los polipéptidos descritos anteriormente (p. ej., las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18) se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de las secuencias, tales como mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para determinar su capacidad de regular al alza la red mencionada anteriormente o ruta de señalización de ApoE/LRP, y desencadenar la respuesta celular respectiva para identificar mutantes que retienen la actividad como se describe más adelante en los ejemplos.

Un equivalente funcional de un polipéptido de esta invención se refiere a un derivado del polipéptido, p. ej., una proteína que tiene una o más mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, truncamientos, una proteína de fusión, o una combinación de los mismos. Retiene sustancialmente la actividad del polipéptido mencionado anteriormente. El polipéptido aislado de esta invención puede contener la secuencia de una de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,

y 18, o un equivalente o fragmento funcional del mismo. En general, el equivalente funcional es al menos un 75% (p. ej., cualquier número entre el 75% y 100%, inclusivo, p. ej., un 70 %, 80%, 85%, 90%, 95%, y 99%) idéntico a una de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18.

Un polipéptido descrito en esta invención puede obtenerse como un polipéptido recombinante. Para preparar un polipéptido recombinante, un ácido nucleico que lo codifica puede unirse a otro ácido nucleico que codifica una pareja de fusión, p. ej., glutatión-s-transferasa (GST), etiqueta de epítopo de 6x His, o proteína del Gen 3 M13. El ácido nucleico de fusión resultante expresa en células huésped adecuadas una proteína de fusión que puede aislarse por métodos conocidos en la técnica. La proteína de fusión aislada puede tratarse, además, p. ej., por digestión enzimática, para eliminar la pareja de fusión y obtener el polipéptido recombinante de esta invención. Alternativamente, el polipéptido de la invención puede sintetizarse químicamente (véase, p. ej., Creighton, “Proteins: Structures and Molecular Principles”, W.H. Freeman & Co., NY, 1983). Para una guía adicional, los expertos pueden consultar Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Ed. 1987 y 1995), Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y síntesis química Gait, M.J. Ed. (Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984).

Debido a sus funciones como proteína celular o proteína de membrana, DNAJA4, LRP1, LRP8, y LXR pueden estar asociadas con, p. ej., conjugadas o fusionadas a, una o más de una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de péptido de penetración celular (CPP), y semejantes. De esta manera, una composición de la invención como se discute más adelante puede incluir un potenciador del transporte. Un péptido de penetración celular (CPP) consiste generalmente en menos de 30 aminoácidos y tiene una carga positiva neta. Los CPP se internalizan en células animales vivas de una manera endocitótica o independiente de receptor/energía. Hay varias clases de CPP con varios orígenes, de CPP totalmente derivados de proteínas a CPP quiméricos a CPP completamente sintéticos. Los ejemplos de CPP son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las Solicitudes de EE.UU. Nos. 20090099066 y 20100279918. Se sabe que los CPP pueden administrar una proteína exógena a varias células.

Todas las versiones naturales, versiones modificadas por ingeniería genética, y versiones sintetizadas químicamente de los polipéptidos mencionados anteriormente pueden usarse para llevar a la práctica la invención descrita en la presente memoria. Los polipéptidos obtenidos por tecnología de ADN recombinante pueden tener la misma secuencia de aminoácidos que una versión natural (p. ej., una de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18) o un equivalente funcional del mismo. También incluyen versiones modificadas químicamente. Los ejemplos de polipéptidos modificados químicamente incluyen polipéptidos sometidos a cambio conformacional, adición o deleción de una cadena lateral, y aquellos a los que se ha unido un compuesto tal como polietilen glicol. Una vez purificados y ensayados por métodos estándar o según el método descrito en los ejemplos más adelante o u otros métodos conocidos en la técnica, los polipéptidos pueden incluirse en una composición adecuada.

Para expresar los factores mencionados anteriormente, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente. Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos se aíslan y/o purifican. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (p. ej., pero no limitado a, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (p. ej., pero no limitado a, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico natural. El término abarca, por lo tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico natural pero no está flanqueada por ambas de las secuencias codificadoras que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que está naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procariota o eucariota de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión.

Los términos “ARN”, “molécula de ARN”, y “molécula de ácido ribonucleico” se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a un polímero de ribonucleótidos. El término “ADN” o “molécula de ADN” o “molécula de ácido desoxirribonucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN pueden sintetizarse naturalmente (p. ej., por replicación del ADN o transcripción del ADN, respectivamente). El ARN puede modificarse después de la transcripción. El ADN y el ARN también pueden sintetizarse químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNss y ADNss, respectivamente) o multicatenarios (p. ej., bicatenarios, es decir, ARNds y ADNds, respectivamente).

La presente invención también proporciona construcciones recombinantes que tienen una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria. Los ejemplos de las construcciones incluyen un vector, tal como un vector plasmídico o viral, en el que se ha insertado una secuencia de ácido nucleico de la invención, en una orientación directa o inversa. En una realización preferida, la construcción incluye además secuencias reguladoras, incluyendo un promotor, unido de forma operativa a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen muchos vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. Los vectores de clonación y expresión apropiados para uso con

huéspedes procariotas y eucariotas también se describen en Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press).

Los ejemplos de vectores de expresión incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, p. ej., derivados de un virus de simio 40 (SV40), plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, y pseudorabia. Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector por una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los polipéptidos descritos anteriormente puede insertarse en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados por procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos y procedimientos de subclonación relacionados están en el alcance de los expertos en la técnica.

La secuencia de ácido nucleico en el vector de expresión mencionado anteriormente está preferiblemente unida de forma operativa a una secuencia de control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos de dichos promotores incluyen: el promotor de la repetición terminal larga (LTR) retroviral o de SV40, el promotor de lac o trp de *E. coli*, el promotor de PL del fago lambda, y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o virus. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción, y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, el vector de expresión contiene preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tal como resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivos de células eucariotas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene las secuencias de ácido nucleico apropiadas como se ha descrito anteriormente, así como un promotor o secuencia de control apropiada, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese los polipéptidos descritos anteriormente. Dichos vectores pueden usarse en terapia génica. Los ejemplos de huéspedes de expresión adecuados incluyen células bacterianas (p. ej., *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*), células fúngicas (levadura), células de insecto (p. ej., *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda* (Sf9)), células animales (p. ej., CHO, COS, y HEK 293), adenovirus, y células de plantas. La selección de un huésped apropiado está en el alcance de los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para producir los polipéptidos mencionados anteriormente por transfección de una célula huésped con un vector de expresión que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los polipéptidos. Las células huésped se cultivan entonces en una condición adecuada, que permite la expresión del polipéptido.

Disminución del nivel de expresión o actividad de los promotores de la metástasis

Como se ha mencionado anteriormente, se puede usar un agente inhibidor que disminuya el nivel de expresión o actividad de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o CTGF para tratar melanoma. Un agente inhibidor (es decir, inhibidor) puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo, o un compuesto que es una molécula pequeña. En un ejemplo, el inhibidor funciona a un nivel de transcripción, estabilidad del ARNm, traducción, estabilidad/degradación de las proteínas, modificación de las proteínas, y unión de las proteínas.

Un inhibidor de ácido nucleico puede codificar un ARN de interferencia pequeño (p. ej., un agente ARNi) que está dirigido a uno o más de los genes mencionados anteriormente, p. ej., CTGF, e inhibe su expresión o actividad. El término “agente ARNi” se refiere a un ARN, o análogo del mismo, que tiene una complementariedad de secuencia suficiente con un ARN diana como para dirigir la interferencia del ARN. Los ejemplos también incluyen un ADN que puede usarse para preparar el ARN. ARN de interferencia (ARNi) se refiere a un proceso específico o selectivo de secuencia mediante el cual una molécula diana (p. ej., un gen, proteína o ARN diana) se regula a la baja. Generalmente, un ARN de interferencia(“ARNi”) es un ARN de interferencia bicatenario corto (ARNsi), ARN de horquilla corta (ARNsh), o micro ARN monocatenario (miARN) que da lugar a la degradación catalítica de ARNm específicos, y también puede usarse para disminuir o inhibir la expresión génica.

El término “ARN de interferencia corto” o “ARNsi” (también conocido como “ARN de interferencia pequeño”) se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente bicatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de longitud, teniendo las cadenas opcionalmente extremos protuberantes que comprenden, por ejemplo 1, 2 o 3 nucleótidos protuberantes (o análogos de nucleótidos), que es capaz de dirigir o mediar la interferencia de ARN. Los ARNsi naturales se generan a partir de moléculas de ARNds más largas (p. ej., >25 nucleótidos de longitud) por la maquinaría de ARNi de una célula (p. ej., Dicer o un homólogo del mismo).

El término “miARN” o “microARN” se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente monocatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de longitud, que es capaz de dirigir o mediar la interferencia de ARN. Los miARN naturales se generan a partir de ARN precursores tallo-bucle (es decir, pre-miARN) por Dicer. El término “Dicer”, tal y como se usa en la presente memoria, incluye Dicer así

como cualquier ortólogo u homólogo de Dicer capaz de procesar estructuras de ARNds en ARNsi, miARN, moléculas semejantes a ARNsi o semejantes a miARN. El término microARN (o "miARN") se usa indistintamente con el término "ARN temporal pequeño" (o "ARNst") sobre la base del hecho de que se ha encontrado que los microARN naturales (o "miARN") se expresan de una forma temporal (p. ej., durante el desarrollo).

El término "ARNsh", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y segunda región de secuencia complementaria, siendo el grado de complementariedad y orientación de las regiones suficiente de manera que se produce el emparejamiento de bases entre las regiones, y estando unidas la primera y segunda regiones por una región de bucle, resultando el bucle de una ausencia de emparejamiento de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) en la región del bucle.

En el alcance de esta invención está la utilización de ARNi que producen la degradación de moléculas de ARN (p. ej., en una célula). La degradación está catalizada por un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) enzimático. Un agente de ARN que tiene una secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana (p. ej., el gen CTGF mencionado anteriormente) para dirigir el ARNi significa que el agente de ARN tiene una homología de al menos el 50%, (p. ej., el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de homología) con la secuencia de ARN diana de manera que los dos son lo suficientemente complementarios entre sí como para hibridar y desencadenar la destrucción del ARN diana por la maquinaría o proceso del ARNi (p. ej., el complejo RISC). Un agente de ARN que tiene una "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana para dirigir ARNi" también significa que el agente de ARN tiene una secuencia suficiente como para desencadenar la inhibición de la traducción del ARN diana por la maquinaría o proceso del ARNi. Un agente de ARN también puede tener una secuencia suficientemente complementaria a un ARN diana codificado por la secuencia de ADN diana de manera que la secuencia de ADN diana se silencia cromáticamente. En otras palabras, el agente de ARN tiene una secuencia suficiente como para inducir el silenciamiento génico transcripcional, p. ej., para modular a la baja la expresión génica en o cerca de la secuencia de ADN diana, p. ej., mediante la inducción de cambios estructurales en la cromatina en o cerca de la secuencia de ADN diana.

Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden administrarse usando dispositivos de administración poliméricos, micropartículas o microcápsulas biodegradables conocidos en la técnica. Otra manera de conseguir la captación de los polinucleótidos es usando liposomas, preparados por métodos estándar. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de administración o coincorporarse con anticuerpos específicos de tejido. Alternativamente, se puede preparar un conjugado molecular compuesto por un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina por fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en las células diana (Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479). Alternativamente, el direccionamiento específico de tejido puede conseguirse por el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que son conocidos en la técnica. La administración de ADN desnudo (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico, o subcutáneo es otro medio para conseguir la expresión *in vivo*.

Las moléculas de ARNsi, miARN, y ARNas (ARN antisentido) pueden diseñarse por métodos muy conocidos en la técnica. Las moléculas de ARNsi, miARN, y ARNas con homología suficiente para proporcionar especificidad de secuencia requerida para degradar únicamente cualquier ARN pueden diseñarse usando programas conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, los mantenidos en los sitios de la red de AMBION, Inc. y DHARMACON, Inc. El ensayo sistemático de varias especies diseñadas para la optimización de la secuencia de ARNsi, miARN, y ARNas puede realizarse de forma rutinaria por los expertos en la técnica. Las consideraciones cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico de interferencia cortas incluyen, pero no están limitadas a, consideraciones biofísicas, termodinámicas, y estructurales, preferencias de base en posiciones específicas en la cadena con sentido, y homología. Estas consideraciones son muy conocidas en la técnica y proporcionan guías para el diseño de las moléculas de ARN mencionadas anteriormente.

Un polinucleótido antisentido (preferiblemente ADN) de la presente invención puede ser cualquier polinucleótido antisentido siempre que posea una complementariedad de secuencia de bases o sea sustancialmente complementaria con la del gen que codifica un componente de la red mencionada anteriormente. La secuencia de bases puede tener al menos aproximadamente un 70%, 80%, 90%, o 95% de homología con el complemento del gen que codifica el polipéptido. Estos ADN antisentido pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN.

El ADN antisentido de la presente invención puede contener azúcares, bases o uniones cambiadas o modificadas. El ADN antisentido, así como el agente de ARNi mencionado anteriormente, también puede proporcionarse en una forma especializada tal como liposomas, microesferas, o puede aplicarse a terapia génica, o puede proporcionarse en combinación con restos unidos. Dichos restos unidos incluyen policationes tales como polilisina que actúan como neutralizadores de carga del núcleo fosfato, o restos hidrofóbicos tales como lípidos (p. ej., fosfolípidos, colesteroles, etc.) que potencian la interacción con las membranas celulares o incrementan la captación del ácido nucleico. Los ejemplos preferidos de los lípidos que se van a unir son colesteroles o derivados de los mismos (p. ej., cloroformato de colesterilo, ácido cólico, etc.). Estos restos pueden estar unidos al ácido nucleico en el extremo 3' o 5' del mismo y también pueden estar unidos al mismo a través de una base, azúcar, o una unión de nucleósido intramolecular. Otros restos pueden ser grupos de recubrimiento específicamente situados en el extremo 3' o 5' del ácido nucleico para prevenir la degradación por nucleasas tales como exonucleasa, ARNasa, etc. Dichos grupos de recubrimiento

incluyen, pero no están limitados a, grupos protectores de hidroxilo conocidos en la técnica, incluyendo glicoles tales como polietilen glicol, tetraetilen glicol y semejantes. La acción inhibidora del ADN antisentido puede examinarse usando un sistema de expresión génica basado en una línea celular o un animal de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

Los ácidos nucleicos discutidos anteriormente que codifican uno o más de los polipéptidos o agentes de ARNi mencionados anteriormente pueden clonarse en un vector para administrarlo a células *in vitro* o *in vivo*. Para los usos *in vivo*, la administración puede tener como diana un tejido u órgano específico (p. ej., la piel). La administración dirigida implica el uso de vectores (p. ej., péptidos dirigidos a órganos) que están dirigidos a órganos o tejidos específicos después de la administración sistémica. Por ejemplo, el vector puede tener un conjugado covalente de avidina y un anticuerpo monoclonal frente a una proteína específica de hígado.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la expresión *in vivo* de los supresores de metástasis mencionados anteriormente. Dicho método conseguiría su efecto terapéutico por la introducción de secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los factores en células o tejidos de un animal humano o no humano que necesita la inhibición del reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica. La administración de las secuencias de ácido nucleico puede conseguirse usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de secuencias de ácido nucleico se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

Varios vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica descritos en la presente memoria incluyen, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus del herpes, vaccinia, o, preferiblemente, un virus con ARN tal como un retrovirus y un lentivirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un lentivirus o un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un único gen extraño incluyen, pero no están limitados a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes.

Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de manera que puedan identificarse y generarse las células transducidas. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de diana mediante la unión, por ejemplo, de un azúcar, un glicolípido, o una proteína. El direccionamiento preferido se consigue usando un anticuerpo específico de diana u hormona que tiene un receptor en la diana. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicas pueden insertarse en el genoma retroviral o unirse a una cubierta viral para permitir la administración específica de diana del vector retroviral.

Otro sistema de direccionamiento para la administración de ácidos nucleicos es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, lechos, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El sistema de dispersión coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. El ARN, ADN, y viriones intactos pueden encapsularse en el interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa. Los métodos para la transferencia génica eficiente usando un vehículo de liposoma son conocidos en la técnica. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Los fosfolípidos ejemplares incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, y distearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible sobre la base de, por ejemplo, especificidad de órgano, especificidad de célula, y especificidad de orgánulo y es conocido en la técnica.

Cuando se usa *in vivo*, es deseable usar un sistema de administración-expresión reversible. Para este fin, puede usarse el sistema Cre-loxP o FLP/FRT y otros sistemas similares para la administración-expresión reversible de uno o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Véanse, WO2005/112620, WO2005/039643, Solicitudes de EE.UU. 20050130919, 20030022375, 20020022018, 20030027335, y 20040216178. En particular, el sistema de administración-expresión reversible descrito en la Solicitud de EE.UU. NO 20100284990 puede usarse para proporcionar una interrupción selectiva o de emergencia.

En otro ejemplo, el agente inhibidor mencionado anteriormente puede ser un polipéptido o un complejo proteico, tal como un anticuerpo. El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina o parte inmunológicamente activa de la misma, es decir, una parte de unión a antígeno. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, una proteína que tiene al menos una o dos, regiones variables (V_H) de cadena pesada (H), y al menos una o dos regiones variables (V_L) de cadena ligera (L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariablidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (“CDR”), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones marco” (FR). Tal y como se usa en la presente memoria, el

término “inmunoglobulina” se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humanos reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina.

El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o “parte de anticuerpo”) se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., LRP1, LRP8, y CTGF). Se ha mostrado que la función de la unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) Nature 341 :544-546), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que permite prepararlos como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véanse, p. ej., Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena única estén englobados en el término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos que se unen específicamente a una de las proteínas diana mencionadas anteriormente (p. ej., CTGF) pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una realización, el anticuerpo puede producirse recombinantemente, p. ej., producirse por exposición en fago o por métodos combinatorios. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano (p. ej., un anticuerpo preparado en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero no limitado a, mono), conejo, o camello. Los ejemplos de métodos para generar una versión humanizada de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, injerto de CDR (Queen *et al*, Pat. de EE.UU. No. 5.585.089; Riechmann *et al*, Nature 332:323 (1988)), intercambio de cadenas (Pat. de EE.UU. No. 5.565.332); y recubrimiento o modificación en superficie (EP 592.106; EP 519.596); Padlan, Molecular Immunology 28(415):489-498 (1991); Studnicka *et al*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al*, PNAS 91: 969-973 (1994)). Los ejemplos de métodos para generar anticuerpos completamente humanos incluyen, pero no están limitados a, generación de anticuerpos a partir de ratones que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana y uso de la tecnología de la exposición en fagos para generar y cribar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana.

Un “anticuerpo aislado” se pretende que se refiera a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CTGF carece sustancialmente de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de dicho antígeno). Además, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otro material y/o compuestos químicos celulares.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal y como se usa en la presente memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión para un epítopo particular.

El término “anticuerpo humano”, tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal y como se usa en la presente memoria, no se pretende que incluya anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana fusionado con una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal y como se usa en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de ellos (descrito adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal y como se usa en la presente memoria, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan indistintamente en la presente memoria con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”. Tal y como se usa en la presente memoria, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, preferiblemente 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos e incluso más preferiblemente 10^{-10} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, más preferiblemente 10^{-8} M o menos.

En un ejemplo, una composición contiene un anticuerpo monoclonal que neutraliza CTGF. En una realización, este anticuerpo puede ser un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero no limitado a, mono), conejo, o camello. En una realización, uno o más aminoácidos de este anticuerpo monoclonal pueden sustituirse con el fin de alterar sus propiedades físicas. Estas propiedades incluyen, pero no están limitadas a, especificidad de unión, afinidad de unión, inmunogenicidad, e isotipo del anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente pueden usarse para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica.

Tal y como se usa en la presente memoria, un “sujeto” se refiere a un animal humano y no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos, tales como mamíferos no humanos, primates no humanos (particularmente primates superiores), perro, roedor (p. ej., ratón o rata), cobaya, gato, y conejo, y no mamíferos, tales como pájaros, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o un animal adecuado como un modelo de enfermedad. Un sujeto que se va a tratar para un trastorno puede identificarse por técnicas de diagnóstico estándar para el trastorno. Opcionalmente, el sujeto puede examinarse para determinar mutación, nivel de expresión, o nivel de actividad de uno o más de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF mencionados anteriormente por métodos conocidos en la técnica o descritos anteriormente antes del tratamiento. Si el sujeto tiene una mutación particular en el gen, o si el nivel de expresión génica o el nivel de actividad es, por ejemplo, mayor en una muestra del sujeto que en una muestra de una persona normal, el sujeto es un candidato para el tratamiento de esta invención.

Para confirmar la inhibición o tratamiento, se puede evaluar y/o verificar la inhibición del reclutamiento endotelial o la angiogénesis resultante usando tecnología conocida en la técnica antes y/o después de la etapa de administración. Las tecnologías ejemplares incluyen angiografía o arteriografía, una técnica de análisis de imagen médica usada para visualizar el interior, o lumen, de los vasos sanguíneos y órganos del cuerpo, que puede hacerse generalmente mediante la inyección de un agente de contraste radio-opaco en el vaso sanguíneo y la formación de imágenes usando técnicas basadas en rayos X tales como fluoroscopía.

“Tratar” o “tratamiento”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno con el propósito de curar, aliviar, atenuar, remediar, retrasar el inicio de, prevenir, o mejorar el trastorno, el síntoma de un trastorno, el estado de enfermedad secundario al trastorno, o la predisposición al trastorno. Una “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad del compuesto o agente que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o conjuntamente con otros fármacos o terapia. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que esté limitada a una formulación o ruta de administración particular.

La expresión “cantidad efectiva”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad suficiente del compuesto de la invención para presentar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará entre sujetos, dependiendo de la especie, edad, y condición general del sujeto, el agente terapéutico particular y semejantes.

Los compuestos de la invención se formulan preferiblemente en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión “forma de dosificación unitaria”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una unidad físicamente discreta apropiada de agente terapéutico para el paciente que se va a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico responsable en el alcance del criterio médico sólido. El nivel de la dosis terapéuticamente efectiva específica para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad anticancerosa del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de la administración, ruta de administración, y tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado; y factores semejantes muy conocidos en las técnicas médicas.

Un agente terapéutico puede administrarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o coadministrarse conjuntamente con otros fármacos o terapia, es decir, una terapia de mezcla. Tal y como se usa en la presente memoria, el término “coadministración” o “coadministrado” se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores, particularmente tumores malignos vascularizados, los agentes pueden usarse solos o en combinación con, p. ej., agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coaguligandos. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o rutas de administración de los varios agentes/terapias usados pueden variar.

En una estrategia *in vivo*, un compuesto o agente se administra a un sujeto. Generalmente, el compuesto se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como, por ejemplo, pero no limitado a, disolución salina fisiológica) y se administra oralmente o por infusión intravenosa, o se inyecta o implanta por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intratecal, por vía intraperitoneal, por vía intrarrectal, por vía intravaginal, por vía intranasal, por vía intragástrica, por vía intratraqueal, o por vía intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la ruta de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; el tamaño, peso, área superficial, edad, y sexo del sujeto; otros fármacos que se están administrando; y el criterio del médico responsable. Las dosificaciones adecuadas están en el rango de 0,01-100 mg/kg. Se esperan variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la variedad de compuestos disponibles y de las diferentes eficiencias de las distintas rutas de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera mayores dosificaciones que la administración por inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para la optimización como se entiende bien en la técnica. La encapsulación del compuesto en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede incrementar la eficiencia de la administración, particularmente para la administración oral.

Composiciones

En el alcance de esta invención está una composición que contiene un vehículo adecuado y uno o más de los agentes terapéuticos descritos anteriormente. La composición puede ser una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable, una composición dietética que contiene un vehículo dietéticamente aceptable adecuado, o una composición cosmética que contiene un vehículo cosméticamente aceptable.

El término “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso de diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable”, después de ser administrado a o en un sujeto, no causa efectos fisiológicos indeseables. El vehículo en la composición farmacéutica debe ser “aceptable” también en el sentido de que sea compatible con el ingrediente activo y pueda ser capaz de estabilizarlo. Pueden utilizarse uno o más agentes solubilizantes como vehículos farmacéuticos para la administración de un compuesto activo. Los ejemplos de un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no están limitados a, vehículos biocompatibles, adyuvantes, aditivos, y diluyentes para conseguir una composición usable como una forma de dosificación. Los ejemplos de otros vehículos incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, lauril sulfato de sodio, y D&C Amarillo No. 10.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sales que son, en el alcance del criterio médico sólido, adecuadas para usarse en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y semejantes excesivos, y son proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables de aminas, ácidos carboxílicos, y otros tipos de compuestos, son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, S.M. Berge, *et al.* describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en *J. Pharmaceutical Sciences*, *66*: 1-19 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención, o separadamente haciendo reaccionar una función de base libre o ácido libre con un reactivo adecuado, como se describe generalmente más adelante. Por ejemplo, una función de base libre puede hacerse reaccionar con un ácido

adecuado. Además, cuando los compuestos de la invención portan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales metálicas tales como sales de metales alcalinos, p. ej., sales de sodio o potasio; y sales de metales alcalinotérreos, p. ej., sales de calcio o magnesio. Los ejemplos de sales de adición a ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables, incluyen sales adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y semejantes. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, que, tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y semejantes, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe varios vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en el caso en el que cualquier medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como por la producción de cualquier efecto biológico indeseable o la interacción de otra forma de una manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, se contempla que su uso está en el alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; goma de tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de alazor, aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilen glicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; fosfolípidos naturales y sintéticos, tales como fosfátidos de soja y de yema de huevo, lecitina, lecitina de soja hidrogenada, dimiristoil lecitina, dipalmitoil lecitina, distearoil lecitina, dioleoil lecitina, lecitina hidroxilada, lisofosfatidilcolina, cardiolipina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diastearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y sus ésteres pegilados, tales como DSPE-PEG750 y, DSPE-PEG2000, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol y fosfatidilserina. Los grados comerciales de lecitina que se prefieren incluyen aquellos que está disponibles con la marca comercial Phosal® o Phospholipon® e incluyen Phosal 53 MCT, Phosal 50 PG, Phosal 75 SA, Phospholipon 90H, Phospholipon 90G y Phospholipon 90 NG; fosfatidilcolina de soja (SoyPC) y DSPE-PEG2000 se prefieren particularmente; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico, y disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes no tóxicos compatibles tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

La composición descrita anteriormente, en cualquiera de las formas descritas anteriormente, puede usarse para tratar melanoma, o cualquier otra enfermedad o afección descrita en la presente memoria. Una cantidad efectiva se refiere a la cantidad de un compuesto/agente activo que se requiere para conferir un efecto terapéutico en un sujeto tratado. Las dosis efectivas variarán, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, la ruta de administración, uso de excipientes, y la posibilidad de uso simultáneo con otro tratamiento terapéutico.

Una composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por vía parenteral, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía tópica, o por vía bucal. El término “parenteral”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, o intracraneal, así como a cualquier técnica de infusión.

Una composición inyectable estéril puede ser una disolución o suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Dichas disoluciones incluyen, pero no están limitados a, 1,3-butanodiol, manitol, agua, disolución de Ringer, y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijados se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión (p. ej., mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como, pero no limitado a, ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de

inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como, pero no limitado a, aceite de oliva o aceite de ricino, versiones polioxietiladas de los mismos. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como, pero no limitado a, carboximetil celulosa, o agentes de dispersión similares. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como, pero no limitado a, Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de la biodisponibilidad, que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también pueden usarse para el propósito de la formulación.

Una composición para la administración oral puede ser una forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones, y disoluciones acuosas. En el caso de comprimidos, los vehículos usados comúnmente incluyen, pero no están limitados a, lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como, pero no limitado a, estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen, pero no están limitados a, lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran oralmente, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase de aceite combinado con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, saporíferos, o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas para la administración tópica según la invención descrita pueden formularse como disoluciones, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles, o aceites. Alternativamente, las formulaciones tópicas pueden estar en la forma de parches o vendajes impregnados con el ingrediente o los ingredientes activos, que pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones preferidas, las formulaciones tópicas incluyen un material que potenciaría la absorción o penetración del o de los agentes activos a través de la piel u otras áreas afectadas.

Una composición tópica contiene una cantidad segura y efectiva de un vehículo dermatológicamente aceptable adecuado para la aplicación en la piel. Una composición o componente “cosméticamente aceptable” o “dermatológicamente aceptable” se refiere a una composición o componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana, sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y semejantes excesivos. El vehículo permite que un agente activo y componente opcional se administre en la piel a una concentración o concentraciones apropiadas. El vehículo puede actuar así como un diluyente, dispersante, disolvente, o semejantes para asegurar que los materiales activos se aplican en y se distribuyen uniformemente sobre la diana seleccionada a una concentración apropiada. El vehículo puede ser sólido, semisólido, o líquido. El vehículo puede estar en la forma de una loción, una crema, o un gel, en particular uno que tiene un espesor suficiente o punto de cedencia para prevenir que los materiales activos sedimenten. El vehículo puede ser inerte o poseer beneficios dermatológicos. También debería ser físicamente y químicamente compatible con los componentes activos descritos en la presente memoria, y no debería alterar excesivamente la estabilidad, eficacia, u otros beneficios del uso asociados con la composición.

Terapias de combinación

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender además un compuesto adicional que tiene actividad antiproliferativa. El compuesto adicional que tiene actividad antiproliferativa puede seleccionarse de un grupo de agentes antiproliferativos incluyendo los mostrados en la Tabla 2.

También se apreciará que los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse y emplearse en terapias de combinación, esto es, los compuestos y composiciones farmacéuticas pueden formularse con o administrarse concurrentemente con, antes de, o posteriormente a, uno o más de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticos o procedimientos) para emplearse en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se quiere conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno, o pueden conseguir diferentes efectos (p. ej., el control de cualquier efecto adverso).

Por “agente antiproliferativo” se quiere decir cualquier agente antiproliferativo, incluyendo los agentes antiproliferativos listados en la Tabla 2, cualquiera de los cuales puede usarse en combinación con un agonista de LXR para tratar las afecciones médicas indicadas en la presente memoria. Los agentes antiproliferativos también incluyen derivados de órgano-platino, derivados de naftoquinona y benzoquinona, ácido crisofánico y derivados de antroquinona de los mismos.

Tabla 2		
Agentes alquilantes	Busulfán dacarbazina ifosfamida hexametilmelamina tiotepa dacarbazina	Clorambucilo procarbazina altretamina fosfato de estramustina mecloretamina estreptozocina

Tabla 2		
	lomustina ciclofosfamida	temozolomida Semustina
Agentes de platino	espiroplatino tetraplatino ormaplatino iproplatino ZD-0473 (AnorMED) oxaliplatino carboplatino	lobaplatino (Aeterna) satraplatino (Johnson Matthey) BBR-3464 (Hoffmann-La Roche) SM-11355 (Sumitomo) AP-5280 (Access) cisplatino
Antimetaboltos	azacitidina Floxuridina 2-clorodeoxiadenosina 6-mercaptopurina 6-tioguanina citarabina 2-fluorodesoxicitidina metotrexato tomudex fludarabina raltitrexed	trimetrexato desoxicoformicina pentostatina hidroxiurea decitabina (SuperGen) clofarabina (Bioenvision) irofulveno (MGI Pharma) DMDC (Hoffmann-La Roche) etinilcitidina (Taiho) gemcitabina capecitabina
Inhibidores de topoisomerasa	amsacrina epirubicina etopósido tenipósido o mitoxantrona 7-etil-10-hidroxi-camptotecina dexrazoxanet (TopoTarget) pixantrona (Novuspharma) análogo de rebecamicina (Exelixis) BBR-3576 (Novuspharma) rubitecán (SuperGen) irinotecán (CPT-11) topotecán	mesilato de exatecán (Daiichi) quinamed (ChemGenex) gimatecán (Sigma-Tau) diflomotecán (Beaufour-Ipsen) TAS-103 (Taiho) elsamitrucina (Spectrum) J-107088 (Merck & Co) BNP-1350 (BioNumerik) CKD-602 (Chong Kun Dang) KW-2170 (Kyowa Hakko) hidroxicamptotecina (SN-38)
Antibióticos antitumorales	valrubicina terarubicina idarubicina rubidazona plicamicina porfiromicina mitoxantrona (novantrona) amonafida	azonafida antrapirazol oxantrazol losoxantrona MEN-10755 (Menarini) GPX-100 (Gem Pharmaceuticals) Epirubicina mitoxantrona doxorubicina
Agentes antimitóticos	colchicina vinblastina vindesina dolastatina 10 (NCI) rizoxina (Fujisawa) mivobulina (Warner-Lambert) cemadotina (BASF) RPR 109881A (Aventis) TXD 258 (Aventis) epotilona B (Novartis) T 900607 (Tularik) T 138067 (Tularik) criptoficina 52 (Eli Lilly) vinflunina (Fabre) auristatina PE (Teikoku Hormone) BMS 247550 (BMS)	E7010 (Abbott) PG-TXL (Cell Therapeutics) IDN 5109 (Bayer) A 105972 (Abbott) A 204197 (Abbott) LU 223651 (BASF) D 24851 (ASTAMedica) ER-86526 (Eisai) combretastatin A4 (BMS) isohomohalicondrina-B (PharmaMar) ZD 6126 (AstraZeneca) AZ10992 (Asahi) IDN-5109 (Indena) AVLB (Prescient NeuroPharma) azaepotilona B (BMS) BNP-7787 (BioNumerik)

Tabla 2		
	BMS 184476 (BMS) BMS 188797 (BMS) taxoprexina (Protarga) SB 408075 (GlaxoSmithKlme) Vinorelbina Tricostatina A	profármaco CA-4 (OXiGENE) dolastatina-10 (NIH) CA-4 (OXiGENE) docetaxel vincristina paclitaxel
Inhibidores de aromatasa	aminoglutetimida atamestano (BioMedicines) letrozol anastrazol	YM-511 (Yamanouchi) formestano exemestano
Inhibidores de timidilato sintasa	pemetrexed (Eli Lilly) ZD-9331 (BTG)	nolatrexed (Eximias) CoFactor™ (BioKeys)
Antagonistas de ADN	trabectedina (PharmaMar) glufosfamida (Baxter International) albúmina + 32P (Isotope Solutions) timectacina (NewBiotics)	edotreótido (Novartis) mafosfamida (Baxter International) apaziquona (Spectrum Pharmaceuticals) O6 bencil guanina (Paligent)
Inhibidores de farnesiltransferasa	arglabina (NuOncology Labs) lonafarnib (Schering-Plough) BAY-43-9006 (Bayer)	tipifarnib (Johnson & Johnson) alcohol perílico (DOR BioPharma)
Inhibidores de bombas	CBT-1 (CBA Pharma) tariquidar (Xenova) MS-209 (Schering AG)	trihidrocloruro de zosuquidar (Eli Lilly) dicitrato de biricodar (Vertex)
Inhibidores de histona acetiltransferasa	tacedinalina (Pfizer) SAHA (Aton Pharma) MS-275 (Schering AG)	butirato de pivaloiloximetilo (Titan) depsipéptido (Fujisawa)
Inhibidores de metaloproteinasa	Neovastat (Aeterna Laboratories) marimastat (British Biotech)	CMT-3 (CollaGenex) BMS-275291 (Celltech)
Inhibidores de ribonucleósido reductasa	maltolato de galio (Titan) triapina (Vion)	tezacitabina (Aventis) didox (Molecules for Health)
Agonistas/antagonistas de TNF alfa	virulizina (Lorus Therapeutics) CDC-394 (Celgene)	revimid (Celgene)
Antagonista del receptor de endotelina A	atrasentán (Abbott) ZD-4054 (AstraZeneca)	YM-598 (Yamanouchi)
Agonistas del ácido retinoico	fenretinida (Johnson & Johnson) LGD-1550 (Ligand)	alitretinoína (Ligand)
Inmunomoduladores	interferón oncofago (Antigenics) GMK (Progenies) vacuna de adenocarcinoma (Biomira) CTP-37 (AVI BioPharma) IRX-2 (Immuno-Rx) PEP-005 (Peplin Biotech) vacunas de synchrovax (CTL Immuno) vacuna de melanoma (CTL Immuno) vacuna de p21 RAS (GemVax)	terapia de dexosoma (Anosys) pentrix (Australian Cancer Technology) ISF-154 (Tragen) vacuna de cáncer (Intercell) norelina (Biostar) BLP-25 (Biomira) MGV (Progenies) β-aletina (Dovetail) terapia de CLL (Vasogen) Ipilimumab (BMS),

Tabla 2		
	MAGE-A3 (GSK) nivolumab (BMS) abatacept (BMS)	CM-10 (cCam Biotherapeutics) MPDL3280A (Genentech)
Agentes hormonales y antihormonales	estrógenos estrógenos conjugados etinil estradiol clortrianiseno idenestrol caproato de hidroxiprogesterona medroxiprogesterona testosterona propionato de testosterona; fluoximesterona metiltestosterona dietilestilbestrol megestrol bicalutamida flutamida nilutamida	dexametasona prednisona metilprednisolona prednisolona aminoglutetimida leuprólido octreótido mitotano P-04 (Novogen) 2-metoxiestradiol (EntreMed) arzoxifeno (Eli Lilly) tamoxifeno toremofina goserelina Leuporelina bicalutamida
Agentes fotodinámicos	talaporfina (Light Sciences) Theralux (Theratechnologies) motexafina gadolinio (Pharmacyclics)	Pd-bacteriofeoforbida (Yeda) texafirina de lutecio (Pharmacyclics) hipericina
Inhibidores de quinasa	imatinib (Novartis) leflunomida (Sugen/Pharmacia) ZD 1839 (AstraZeneca) erlotinib (Oncogene Science) canertinib (Pfizer) escualamina (Genaera) SU5416 (Pharmacia) SU6668 (Pharmacia) ZD4190 (AstraZeneca) ZD6474 (AstraZeneca) vatalanib (Novartis) PKI166 (Novartis) GW2016 (GlaxoSmithKline) EKB-509 (Wyeth) trastuzumab (Genentech) OSI-774 (Tarceva™) CI-1033 (Pfizer) SU11248 (Pharmacia) RH3 (York Medical) Genisteína Radicinol Met-MAb (Roche)	EKB-569 (Wyeth) kahalido F (PharmaMar) CEP-701 (Cephalon) CEP-751 (Cephalon) MLN518 (Millenium) PKC412 (Novartis) Fenoxodiol (Novogen) C225 (ImClone) rhu-Mab (Genentech) MDX-H210 (Medarex) 2C4 (Genentech) MDX-447 (Medarex) ABX-EGF (Abgenix) IMC-1C11 (ImClone) Tirfostinas Gefitinib (Iressa) PTK787 (Novartis) EMD 72000 (Merck) Emodina Radicinol Vemurafenib (inhibidor de la enzima B-Raf, Daiichi Sankyo)

Tabla 2	
SR-27897 (inhibidor de CCK A, Sanofi- Synthelabo)	ceflatonina (promotor de la apoptosis, ChemGenex)
tocladesina (agonista de AMP cíclico, Ribapharm)	BCX-1777 (inhibidor de PNP, BioCryst)
alvocidib (inhibidor de CDK, Aventis)	ranpirnasa (estimulante de ribonucleasa, Alfacell)
CV-247 (inhibidor de COX-2, Ivy Medical)	galarubicina (inhibidor de la síntesis de ARN, Dong-A)
P54 (inhibidor de COX-2, Phytopharm)	tirapazamina (agente reductor, SRI International)
CapCell™ (estimulante de CYP450, Bavarian Nordic)	N-acetilcisteína (agente reductor, Zambon)
GCS-100 (antagonista de gal3, GlycoGenesys)	R-flurbiprofeno (inhibidor de NF-kappaB, Encore)
Inmunógeno G17DT (inhibidor de gastrina, Aphton)	3CPA (inhibidor de NF-kappaB, Active Biotech)
efaproxiral (oxigenador, Alios Therapeutics)	seocalcitol (agonista del receptor de la vitamina D, Leo)
PI-88 (inhibidor de heparanasa, Progen)	131-I-TM-601 (antagonista de ADN, TransMolecular)
tesmilifeno (antagonista de histamina, YM Biosciences)	eflornitina (inhibidor de ODC, ILEX Oncology)
histamina (agonista del receptor de histamina H2, Maxim)	ácido minodrónico (inhibidor de osteoclastos, Yamanouchi)
tiazofurina (inhibidor de IMPDH, Ribapharm)	indisulam (estimulante de p53, Eisai)
cilengitida (antagonista de integrina, Merck KGaA)	aplidina (inhibidor de PPT, PharmaMar)
SR-31747 (antagonista de IL-1, Sanofi-Synthelabo)	gemtuzumab (anticuerpo CD33, Wyeth Ayerst)
CCI-779 (inhibidor de mTOR quinasa, Wyeth)	PG2 (potenciador de la hematopoyesis, Pharmagenesis)
exisulind (inhibidor de PDE V, Cell Pathways)	Immunol™ (lavado oral de triclosán, Endo)
CP-461 (inhibidor de PDE V, Cell Pathways)	triacetiluridina (profármaco de uridina, Wellstat)
AG-2037 (inhibidor de GART, Pfizer)	SN-4071 (agente de sarcoma, Signature Bioscience)
WX-UK1 (inhibidor del activador de plasminógeno, Wilex)	TransMID-107™ (inmunotoxina, KS Biomedix)
PBI-1402 (estimulante de PMN, ProMetic LifeSciences)	PCK-3145 (promotor de la apoptosis, Procyon)
bortezomib (inhibidor del proteasoma, Millennium)	doranidazol (promotor de la apoptosis, Pola)
SRL-172 (estimulante de células T, SR Pharma)	CHS-828 (agente citotóxico, Leo)
TLK-286 (inhibidor de la glutatión S transferasa, Telik)	ácido trans-retinoico (diferenciador, NIH)
PT-100 (agonista de factor de crecimiento, Point Therapeutics)	MX6 (promotor de la apoptosis, MAXIA)
midostaurina (inhibidor de PKC, Novartis)	apomina (promotor de la apoptosis, ILEX Oncology)
briostatina-1 (estimulante de PKC, GPC Biotech)	urocidina (promotor de la apoptosis, Bioniche)
CDA-II (promotor de la apoptosis, Everlife)	Ro-31-7453 (promotor de la apoptosis, La Roche)
SDX-101 (promotor de la apoptosis, Salmedix)	brostalicina (promotor de la apoptosis, Pharmacia)
rituximab (anticuerpo CD20, Genentech	β-lapacona
carmustina	gelonina
Mitoxantrona	cafestol
Bleomicina	
Absintina	
Ácido crisofánico	
Óxidos de cesio	
Inhibidores de BRAF	
Inhibidores de PDL1	
Inhibidores de MEK	

Métodos de diagnóstico y pronóstico

Los genes descritos anteriormente pueden usarse para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, melanoma metastásico. Alternativamente, pueden usarse para determinar un pronóstico de dicho trastorno en un sujeto.

Métodos de diagnóstico

En un aspecto, la invención proporciona información cualitativa y cuantitativa para determinar si un sujeto tiene o está predispuesto a melanoma metastásico u otra enfermedad caracterizada por reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica. Un sujeto que tiene dicho trastorno o es propenso al mismo puede determinarse sobre la base de los niveles, patrones o perfiles de expresión de los genes descritos anteriormente o sus productos (ARNm, microARN, o polipéptidos) en una muestra de ensayo del sujeto. En otras palabras, los productos pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia del trastorno. Los ensayos de diagnóstico y pronóstico de la invención incluyen métodos para evaluar el nivel de expresión de los productos. Los métodos nos permiten detectar el trastorno. Por ejemplo, un incremento relativo del nivel de expresión de uno o más promotores (es decir, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF) es indicativo de la presencia del trastorno. A la inversa, un nivel de expresión bajo o una ausencia de la expresión es indicativo de ausencia del trastorno.

La presencia, nivel, o ausencia de un producto de ARNm, microARN, o polipéptido en una muestra de ensayo puede evaluarse mediante la obtención de una muestra de ensayo de un sujeto de ensayo y la puesta en contacto de la

muestra de ensayo con un compuesto o un agente capaz de detectar el ácido nucleico (p. ej., sonda de ARN o ADN) o polipéptido. La “muestra de ensayo” incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. El nivel de expresión de un gen o genes de interés puede medirse de varias maneras, incluyendo la medición del ARN codificado por el gen.

Las muestras de ARN expresado pueden aislarse de muestras biológicas usando varios procedimientos muy conocidos. Por ejemplo, las muestras biológicas pueden lisarse en un tampón de lisis basado en guanidinio, que contiene opcionalmente componentes adicionales para estabilizar el ARN. En algunas realizaciones, el tampón de lisis puede contener ARN purificados como controles para monitorizar la recuperación y estabilidad del ARN de cultivos celulares. Los ejemplos de dichos moldes de ARN purificado incluyen el ARN control positivo para kanamicina de PROMEGA (Madison, WI), y ARN con cola de poli(A) de 7,5 kb de LIFE TECHNOLOGIES (Rockville, MD). Los lisados pueden usarse inmediatamente o almacenarse congelados, p. ej., a -80 °C.

Opcionalmente, el ARN total puede purificarse de lisados celulares (u otros tipos de muestras) usando el aislamiento basado en sílice en un formato de 96 pocillos compatible con la automatización, tal como la plataforma de purificación RNEASY (QIAGEN, Inc., Valencia, CA). Se contemplan otros métodos de aislamiento de ARN, tales como extracción con lechos recubiertos de sílice o guanidinio. Un experto en la técnica puede concebir métodos adicionales para el aislamiento y preparación de los ARN.

Los métodos de la presente invención pueden realizarse usando muestras crudas (p. ej., sangre, suero, plasma, o lisados celulares), eliminando la necesidad de aislar el ARN. Se añaden opcionalmente inhibidores de ARNasa a las muestras crudas. Cuando se usan lisados celulares crudos, debe indicarse que el ADN genómico puede proporcionar una o más copias de una secuencia diana, p. ej., un gen, dependiendo de la muestra. En situaciones en las que la secuencia diana deriva de uno o más genes altamente expresados, la señal que surge del ADN genómico puede no ser significativa. Pero para los genes expresados a bajos niveles, el fondo puede eliminarse tratando las muestras con ADNasa, o usando cebadores dirigidos a las uniones de corte y empalme para el cebado posterior de ADNc o los productos de la amplificación.

El nivel de ARN correspondiente a un gen en una célula puede determinarse tanto *in situ* como *in vitro*. El ARN aislado de una muestra de ensayo puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen análisis Southern o Northern, análisis por PCR, y matrices de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de ARN implica poner en contacto el ARN aislado con una sonda de ácido nucleico que puede hibridar con el ARN codificado por el gen. La sonda puede ser un ácido nucleico de longitud completa o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 10 nucleótidos de longitud y suficiente como para hibridar específicamente en condiciones astringentes con el ARN.

En un formato, el ARN (o ADNc preparado a partir de este) se inmoviliza en una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, corriendo el ARN aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARN del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En otro formato, las sondas se inmovilizan en una superficie y el ARN (o ADNc) se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en una matriz de chip de genes. Un experto en la técnica puede adaptar métodos de detección de ARN conocidos para detectar el nivel de ARN.

El nivel de ARN (o ADNc preparado a partir de este) en una a muestra codificado por un gen que se va a examinar puede evaluarse con la amplificación de ácido nucleico, p. ej., por PCR estándar (Patente de EE.UU. No. 4.683.202), RT-PCR (Bustin S. J Mol Endocrinol. 25: 169-93, 2000), PCR cuantitativa (Ong Y. *et al.*, Hematology. 7:59-67, 2002), PCR en tiempo real (Ginzinger D. Exp Hematol. 30:503-12, 2002), y PCR *in situ* (Thaker V. Methods Mol Biol. 115:379-402, 1999), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas en la técnica. En otra realización, los métodos de la invención incluyen además poner en contacto una muestra control con un compuesto o agente capaz de detectar el ARN de un gen y comparar la presencia del ARN en la muestra control con la presencia del ARN en la muestra de ensayo.

Los métodos y marcadores descritos anteriormente pueden usarse para evaluar el riesgo de un sujeto para desarrollar melanoma. En particular, la invención puede aplicarse a aquellos en cohorte de alto riesgo que ya tienen determinados riesgos de manera que se obtenga una información crítica en la detección temprana. Un cambio en los niveles de los productos génicos miR asociado con melanoma puede detectarse ante de, o en los estadios tempranos de, el desarrollo de fenotipos transformados o neoplásicos en células de un sujeto. La invención, por lo tanto, proporciona también un método para cribar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar melanoma, que comprende evaluar el nivel de al menos un producto génico, o una combinación de productos génicos, asociado con melanoma en una muestra biológica obtenida de la piel del sujeto. De acuerdo con esto, una alteración en el nivel del producto génico, o combinación de productos génicos, en la muestra biológica comparado con el nivel de un producto génico correspondiente en una muestra control, es indicativo de que el sujeto está en riesgo de desarrollar melanoma. La muestra biológica usada para dicho cribado puede incluir tejido de la piel que es bien normal o se sospecha que es canceroso. Los sujetos con un cambio en el nivel de uno o más productos génicos asociados con melanoma son candidatos para una monitorización y ensayo adicionales. Dicho ensayo adicional puede comprender un examen histológico de muestras de tejido, u otras técnicas dentro de la técnica.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “diagnóstico” significa detectar una enfermedad o trastorno o determinar el estadio o grado de una enfermedad o trastorno. Usualmente, un diagnóstico de una enfermedad o trastorno se basa en la evaluación de uno o más factores y/o síntomas que son indicativos de la enfermedad. Esto es, un diagnóstico puede hacerse sobre la base de la presencia, ausencia o cantidad de un factor que es indicativo de la presencia o ausencia de la enfermedad o afección. Cada factor o síntoma que se considera indicativo para el diagnóstico de una enfermedad particular no necesita estar relacionado exclusivamente con la enfermedad particular; es decir, puede haber diagnósticos diferenciales que pueden inferirse de un factor o síntoma del diagnóstico. Asimismo, puede haber casos en los que un factor o síntoma que es indicativo de una enfermedad particular está presente en un individuo que no tiene la enfermedad particular. Los métodos de diagnóstico pueden usarse independientemente, o en combinación con otros métodos de diagnóstico y/o estadificación conocidos en la técnica médica para una enfermedad o trastorno particular, p. ej., melanoma.

Métodos de pronóstico

Los métodos de diagnóstico descritos anteriormente pueden identificar a sujetos que tienen, o están en riesgo de desarrollar, un melanoma. Además, los cambios en los niveles de expresión y/o tendencias de los genes mencionados anteriormente en una muestra biológica, p. ej., muestras de sangre periférica, pueden proporcionar una indicación temprana de la recuperación o ausencia de la misma. Por ejemplo, un incremento adicional (o disminución) o niveles de expresión génica alterados persistentemente de los genes promotores (o genes inhibidores) indican un mal pronóstico, es decir, la ausencia de mejoría o deterioro de la salud. De acuerdo con esto, estos genes permiten evaluar la recuperación posterior al tratamiento de melanoma. El análisis de este grupo seleccionado de genes o de un subconjunto de los mismos indica los resultados de las afecciones.

Los ensayos de pronóstico descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar si un sujeto es adecuado para la administración de un agente (p. ej., un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato) para tratar melanoma u otro trastorno asociado con el reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica. Por ejemplo, dichos ensayos pueden usarse para determinar si puede administrarse a un sujeto un agente quimioterapéutico.

Así, esta invención también proporciona un método para monitorizar un tratamiento para un trastorno de proliferación celular en un sujeto. Para este propósito, pueden determinarse los niveles de expresión génica de los genes descritos en la presente memoria para muestras de ensayo de un sujeto antes, durante, o después de someterse a tratamiento. Se evalúan entonces las magnitudes de los cambios en los niveles comparado con un nivel de línea base. Una disminución en la expresión de los genes promotores mencionados anteriormente (miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF) después del tratamiento indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente con el mismo tratamiento. De forma similar, un incremento en los inhibidores (DNAJA4, ApoE, LRP1, y LRP8) también indica que el sujeto puede tratarse adicionalmente con el mismo tratamiento. A la inversa, un incremento adicional o niveles de expresión persistentes altos de uno o más de los genes promotores es indicativo de ausencia de mejoría o deterioro de la salud.

La información obtenida de la práctica de los ensayos anteriores es útil en el pronóstico, identificación de la progresión de, y gestión clínica de enfermedades y otras afecciones perjudiciales que afectan el estado se salud de un sujeto individual. En realizaciones preferidas, los ensayos de diagnóstico anteriores proporcionan información útil en el pronóstico, identificación de la progresión de, y gestión clínica de melanoma y otras afecciones caracterizadas por el reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica. La información ayuda más específicamente al médico en el diseño de regímenes quimioterapéuticos u otros regímenes de tratamiento para erradicar dichas afecciones del cuerpo de un sujeto afectado, un ser humano.

El término “pronóstico”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una predicción del curso y resultado probable de una afección o enfermedad clínica. Un pronóstico se hace habitualmente mediante la evaluación de factores o síntomas de una enfermedad que son indicativos de un curso o resultado favorable o desfavorable de la enfermedad. La expresión “determinar el pronóstico”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al proceso mediante el cual el experto en la técnica puede predecir el curso o resultado de una afección en un paciente. El término “pronóstico” no se refiere a la capacidad de predecir el curso o resultado de una afección con una exactitud del 100%, en lugar de esto, el experto en la técnica entenderá que el término “pronóstico” se refiere a una probabilidad incrementada de que se producirá un determinado curso o resultado; esto es, que es más probable que se produzca un curso o resultado en un paciente que presenta una afección dada, cuando se compara con aquellos individuos que no presentan la afección.

Los términos “pronóstico favorable” y “pronóstico positivo”, o “pronóstico desfavorable” y “pronóstico negativo”, tal y como se usan en la presente memoria, son términos relativos para la predicción del curso probable y/o resultado posible de una afección o una enfermedad. Un pronóstico favorable o positivo predice un mejor resultado para una afección que un pronóstico desfavorable o negativo. En un sentido general, un “pronóstico favorable” es un resultado que es relativamente mejor que muchos otros pronósticos posibles que podrían estar asociados con una afección particular, mientras un pronóstico desfavorable predice un resultado que es relativamente peor que muchos otros pronósticos posibles que podrían estar asociados con una afección particular. Los ejemplos típicos de un pronóstico favorable o positivo incluyen una tasa de cura mejor que el promedio, una menor propensión a metástasis, una

esperanza de vida más larga de la esperada, la diferenciación de un proceso benigno de un proceso canceroso, y semejantes. Por ejemplo, un pronóstico positivo es uno en el que un paciente tiene una probabilidad del 50% de curarse de un cáncer particular después del tratamiento, mientras el paciente promedio con el mismo cáncer tiene solo una probabilidad del 25% de curarse.

Los términos “determinar”, “medir”, “evaluar”, y “ensayar” se usan indistintamente e incluyen tanto la medición cuantitativa como cualitativa, e incluyen determinar si una característica, rasgo, o propiedad está o no presente. La evaluación puede ser relativa o absoluta. “Evaluar la presencia de” una diana incluye determinar la cantidad de la diana presente, así como determinar si está presente o ausente.

Matrices

En la invención también se proporciona un biochip o matriz. El biochip/matriz puede contener un sustrato sólido o semisólido que tiene unida una sonda o pluralidad de sondas descritas en la presente memoria. Las sondas pueden ser capaces de hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación astringentes. Las sondas pueden estar unidas en un sitio definido espacialmente en el sustrato. Puede usarse más de una sonda por secuencia diana, bien con sondas superpuestas o sondas para diferentes secciones de una secuencia diana particular. Las sondas pueden ser capaces de hibridar con secuencias diana asociadas con un único trastorno apreciado por los expertos en la técnica. Las sondas pueden bien sintetizarse en primer lugar, con la unión posterior al biochip, o pueden sintetizarse directamente en el biochip.

“Unido” o “inmovilizado”, tal y como se usa en la presente memoria para hacer referencia a un ácido nucleico (p. ej., una sonda) y un soporte sólido puede significar que la unión entre la sonda y el soporte sólido es suficiente como para ser estable en las condiciones de unión, lavado, análisis, y retirada. La unión puede ser covalente o no covalente. Los enlaces covalentes pueden formarse directamente entre la sonda y el soporte sólido o pueden formarse por un entrecruzador o por la inclusión de un grupo reactivo específico bien en el soporte sólido o en la sonda o en ambas moléculas. La unión no covalente puede ser una o más de interacciones electrostáticas, hidrofílicas, e hidrofóbicas. En la unión no covalente se incluye la unión covalente de una molécula, tal como estreptavidina, al soporte y la unión no covalente de una sonda biotinilada a la estreptavidina. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalentes y no covalentes.

El sustrato sólido puede ser un material que puede modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de las sondas y es susceptible para al menos un método de detección. Los ejemplos de dichos sustratos incluyen vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, TeflónJ, etc.), polisacáridos, nilón o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios y plásticos inorgánicos. Los sustratos pueden permitir la detección óptica sin emitir fluorescencia apreciablemente.

El sustrato puede ser plano, aunque también pueden usarse otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas pueden ponerse en la superficie interior de un tubo, para el análisis con flujo continuo de la muestra para minimizar el volumen de la muestra. De forma similar, el sustrato puede ser flexible, tal como espuma flexible, incluyendo espumas de células cerradas hechas de plásticos particulares.

La matriz/biochip y la sonda pueden derivatizarse con grupos químicos funcionales para la unión posterior de los dos. Por ejemplo, el biochip puede derivatizarse con un grupo químico funcional incluyendo, pero no limitado a, grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo o grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, las sondas pueden unirse usando grupos funcionales en las sondas bien directamente o indirectamente usando un conector. Las sondas pueden unirse al soporte sólido bien por el extremo 5', el extremo 3', o a través de un nucleótido interno. La sonda también puede unirse al soporte sólido de forma no covalente. Por ejemplo, pueden prepararse oligonucleótidos biotinilados, que pueden unirse a superficies recubiertas covalentemente con estreptavidina, lo que da lugar a la unión. Alternativamente, las sondas pueden sintetizarse en la superficie usando técnicas tales como fotopolimerización y fotolitografía. Una discusión detallada de los métodos para unir ácidos nucleicos a un sustrato de soporte puede encontrarse, p. ej., en las Patentes de EE.UU. Nos. 5837832, 6087112, 5215882, 5707807, 5807522, 5958342, 5994076, 6004755, 6048695, 6060240, 6090556, y 6040138.

En algunas realizaciones, un transcrito expresado (p. ej., un transcrito de un gen de microARN descrito en la presente memoria) está representado en las matrices de ácido nucleico. En dichas realizaciones, un conjunto de sitios de unión puede incluir sondas con diferentes ácidos nucleicos que son complementarios diferentes segmentos de la secuencia del transcrito expresado. Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos pueden tener una longitud de 15 a 200 bases, 20 a 100 bases, 25 a 50 bases, 40 a 60 bases. Cada secuencia de sonda también puede incluir una o más secuencias conectoras además de la secuencia que es complementaria a su secuencia diana. Una secuencia conectora es una secuencia entre la secuencia que es complementaria a su secuencia diana y la superficie del soporte. Por ejemplo, las matrices de ácido nucleico de la invención pueden tener una sonda específica para cada gen de microARN diana. Sin embargo, si se desea, las matrices de ácido nucleico pueden contener al menos 2, 5, 10, 100, 200, 300, 400, 500

o más sondas específicas para algún transcrito expresado (p. ej., un transcrito de un gen de microARN descrito en la presente memoria).

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que incluyen los métodos, composiciones, y sistemas para el análisis de la expresión de los polipéptidos y microARN como se describe en la presente memoria. Dicho kit puede contener un ácido nucleico descrito en la presente memoria junto con cualquiera o todos de los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, sondas y/o cebadores, y disolución salina estéril u otra base de emulsión o suspensión farmacéuticamente aceptable. Además, el kit puede incluir materiales de instrucción que contienen indicaciones (p. ej., protocolos) para llevar a la práctica los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el kit puede ser un kit para la amplificación, detección, identificación o cuantificación de una secuencia de ARNm o microARN diana. Para este fin, el kit puede contener un cebador adecuado (p. ej., cebadores de horquilla), un cebador directo, un cebador inverso, y una sonda.

En un ejemplo, un kit de la invención incluye uno o más portaobjetos de micromatriz (o formato de micromatriz alternativo) en los que se ha depositado una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos (cada uno correspondiente a uno de los genes mencionados anteriormente). El kit también puede incluir una pluralidad de sondas marcadas. Alternativamente, el kit puede incluir una pluralidad de secuencias de polinucleótidos adecuadas como sondas y una selección de marcadores adecuados para personalizar las secuencias de polinucleótidos incluidas, u otras secuencias de polinucleótidos a la discreción del médico. Comúnmente, al menos una secuencia de polinucleótido incluida corresponde a una secuencia control, p. ej., un gen de normalización o semejante. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un fluoróforo, un tinte, un radiomarcador, una etiqueta enzimática, que está unido a un cebador de ácido nucleico.

En una realización, se proporcionan kits que son adecuados para amplificar ácido nucleico correspondiente a las muestras de ARN expresado. Dicho kit incluye reactivos y cebadores adecuados para uso en cualquiera de los métodos de amplificación descritos anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, los kits son adecuados para amplificar una señal correspondiente a una hibridación entre una sonda y una muestra de ácido nucleico diana (p. ej., depositada en una micromatriz).

Además, se incluyen opcionalmente en el kit uno o más materiales y/o reactivos requeridos para preparar una muestra biológica para el análisis de la expresión génica. Además, en los kits se incluyen opcionalmente una o más enzimas adecuadas para amplificar los ácidos nucleicos, incluyendo varias polimerasas (RT, Taq, etc.), uno o más desoxinucleótidos, y tampones para proporcionar la mezcla de reacción necesaria para la amplificación.

Típicamente, los kits se emplean para analizar patrones de expresión génica usando ARNm o microARN como el molde de partida. El molde de ARN puede presentarse bien como ARN celular total o ARN aislado; ambos tipos de muestra rinden resultados comparables. En otras realizaciones, los métodos y kits descritos en la presente invención permiten la cuantificación de otros productos de la expresión génica, incluyendo ARNt, ARNr, o u otros productos de la transcripción.

Opcionalmente, los kits de la invención incluyen además software para acelerar la generación, análisis y/o almacenamiento de datos, y para facilitar el acceso a bases de datos. El software incluye instrucciones lógicas, conjuntos de instrucciones, o programas informáticos adecuados que pueden usarse en la recogida, almacenamiento y/o análisis de los datos. El análisis comparativo y relacional de los datos es posible usando el software proporcionado.

Los kits contienen opcionalmente distintos contenedores para cada reactivo y/o componente enzimático individual. Cada componente generalmente será adecuado según está alicuotado en su contenedor respectivo. El contenedor de los kits incluye opcionalmente al menos un vial, ampolla, o tubo de ensayo. También son posibles frascos, botellas y otros mecanismos de contenedores en los que pueden ponerse y/o alicuotarse los reactivos. Los contenedores individuales del kit se mantienen preferiblemente en confinamiento cerrado para la venta comercial. Los contenedores más grandes adecuados pueden incluir contenedores de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los viales deseados. Con el kit se proporcionan opcionalmente instrucciones, tales como indicaciones escritas o demostraciones en vídeo que detallan el uso de los kits de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de cualquier composición o kit de la presente memoria, para llevar a la práctica cualquier método o ensayo de la presente memoria, y/o para el uso de cualquier aparato o kit para llevar a la práctica cualquier ensayo o método de la presente memoria.

Una “muestra de ensayo” o una “muestra biológica”, tal y como se usa en la presente memoria, puede significar una muestra de tejido o fluido biológico que comprende ácidos nucleicos. Dichas muestras incluyen, pero no están limitadas a, tejido o fluido corporal aislado de animales. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas para propósitos histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, orina, efusiones, fluido amniótico, fluido ascítico, pelo, y piel. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de

tejidos de pacientes. Una muestra biológica puede proporcionarse retirando una muestra de células de un animal, pero también puede conseguirse usando células aisladas previamente (p. ej., aisladas por otra persona, en otro momento, y/o para otro propósito), o realizando los métodos descritos en la presente memoria *in vivo*. También pueden usarse tejidos de archivo, tales como aquellos que tienen un historial de tratamiento o resultado.

El término "fluido corporal" o "fluido del cuerpo" se refiere a cualquier fluido del cuerpo de un animal. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, pero no están limitados a, plasma, suero, sangre, fluido linfático, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, orina, saliva, mucosa, flemas y esputo. Una muestra de fluido corporal puede recogerse por cualquier método adecuado. La muestra de fluido corporal puede usarse inmediatamente o puede almacenarse para un uso posterior. Puede usarse cualquier método de almacenamiento adecuado conocido en la técnica para almacenar la muestra de fluido corporal: por ejemplo, la muestra puede congelarse a aproximadamente -20 °C a aproximadamente -70 °C. Los fluidos corporales adecuados son fluidos acelulares. Los fluidos "acelulares" incluyen muestras de fluido corporal en las que las células están ausentes o están presentes en cantidades tan bajas que el nivel de miARN determinado refleja su nivel en la parte líquida de la muestra, en lugar de en la parte celular. Dichos fluidos corporales acelulares se producen generalmente mediante el procesamiento de un fluido corporal que contiene células, por ejemplo, por centrifugación o filtración, para eliminar las células. Típicamente, un fluido corporal acelular no contiene células intactas, sin embargo, algunos pueden contener fragmentos celulares o restos celulares. Los ejemplos de fluidos acelulares incluyen plasma o suero, o fluidos corporales de los que se han eliminado las células.

El término "gen" usado en la presente memoria se refiere a un gen natural (p. ej., genómico) o sintético que comprende secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificadora y/o secuencias no traducidas (p. ej., intrones, secuencias no traducidas en 5' y 3'). La región codificadora de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNsi, miARN o ARN antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificadoras (p. ej., exones y miARN) que comprende opcionalmente secuencias no traducidas en 5' o 3' unidas al mismo. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende todo o una parte de la región codificadora y/o secuencias no traducidas en 5' o 3' unidas al mismo. El término también incluye pseudogenes, que son derivados disfuncionales de genes conocidos que han perdido su capacidad de codificar proteínas o no se expresan ya en una célula.

"Perfil de expresión", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un perfil de expresión genómico, p. ej., un perfil de expresión de microARN. Los perfiles pueden generarse por cualquier medio conveniente para determinar un nivel de una secuencia de ácido nucleico p. ej., hibridación cuantitativa de microARN, ARNc, etc., PCR cuantitativa, ELISA para cuantificación, y semejantes, y permite el análisis de la expresión génica diferencial entre dos muestras. Se ensaya una muestra de un sujeto o paciente, p. ej., células o una colección de las mismas, p. ej., tejidos. Las muestras se recogen por cualquier método conveniente, como se conoce en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico de interés son secuencias de ácido nucleico que se encuentra que son predictivas, incluyendo las secuencias de ácido nucleico de las descritas en la presente memoria, en las que el perfil de expresión puede incluir datos de la expresión para 5, 10, 20, 25, 50, 100 o más de, incluyendo todas las secuencias de ácido nucleico listadas. El término "perfil de expresión" también puede significar la medición de la abundancia de las secuencias de ácido nucleico en las muestras medidas.

"Expresión diferencial" se refiere a diferencias cualitativas o cuantitativas en los patrones de la expresión génica temporal y/o celular en y entre células y tejido. Así, un gen expresado diferencialmente puede tener su expresión alterada cualitativamente, incluyendo una activación o inactivación, en, p. ej., tejido normal frente a enfermo. Los genes pueden activarse o desactivarse en un estado particular, respecto a otro estado, permitiendo así la comparación de dos o más estados. Un gen regulado cualitativamente presentará un patrón de expresión en un estado o tipo celular que puede ser detectable por técnicas estándar. Algunos genes se expresarán en un estado o tipo celular, pero no en ambos. Alternativamente, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, p. ej., en que la expresión se modula, se regula al alza, dando lugar a una cantidad incrementada de transcrito, o se regula a la baja, dando lugar a una cantidad disminuida de transcrito. Solo es necesario que el grado mediante el que la expresión se diferencia sea lo suficientemente grande como para cuantificarlo mediante técnicas de caracterización estándar, tales como matrices de expresión, PCR cuantitativa con transcriptasa inversa, análisis Northern, y protección de ARNasa.

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La representación de una única cadena también define la secuencia de la cadena complementaria. Así, un ácido nucleico también engloba la cadena complementaria de una cadena única representada. Pueden usarse muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico dado. Así, un ácido nucleico también engloba ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una única cadena proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación astringentes. Así, un ácido nucleico también engloba una sonda que hibrida en condiciones de hibridación astringentes.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener partes tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo y ribonucleótidos, y combinaciones de bases

incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

El término “cebador” se refiere a cualquier ácido nucleico que es capaz de hibridar en su extremo 3' con una molécula de ácido nucleico complementaria, y que proporciona un extremo hidroxilo libre en 3' que puede prolongarse por una polimerasa de ácido nucleico. Tal y como se usa en la presente memoria, los cebadores de amplificación son una pareja de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar con regiones 5' o 3' de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o viceversa) y contener una región corta entre ellas. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores. Para los métodos *in situ*, una muestra de células o tejido puede prepararse e inmovilizarse en un soporte, tal como un portaobjetos de vidrio, y después ponerse en contacto con una sonda que puede hibridar con ARN. Los métodos alternativos para amplificar ácidos nucleicos correspondientes a muestras de ARN expresado incluyen los descritos, p. ej., en la Patente de EE.UU. No. 7.897.750.

El término “sonda”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido capaz de unirse a un ácido nucleico diana con secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través del emparejamiento de bases complementarias, habitualmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de una complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la astringencia de las condiciones de hibridación. Puede haber cualquier número de faltas de concordancia en el emparejamiento de las bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios descritos en la presente memoria. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede producirse hibridación incluso en las condiciones de hibridación menos astringentes, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Una sonda puede ser monocatenaria o parcialmente monocatenaria y parcialmente bicatenaria. La disposición de las cadenas de la sonda está dictada por la estructura, composición, y propiedades de la secuencia diana. Las sondas pueden estar marcadas directamente o marcadas indirectamente tal como con biotina a la que posteriormente puede unirse un complejo de estreptavidina.

“Complemento” o “complementario”, tal y como se usa en la presente memoria para hacer referencia a un ácido nucleico puede significar el emparejamiento de bases de Watson-Crick (p. ej., A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótido de moléculas de ácido nucleico. Un complemento completo o completamente complementario puede significar un 100% de emparejamiento de bases complementarias entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

“Condiciones de hibridación astringentes”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a condiciones en las cuales una primera secuencia de ácido nucleico (p. ej., sonda) hibrida con una segunda secuencia de ácido nucleico (p. ej., diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones astringentes son dependientes de secuencia y son diferentes en diferentes circunstancias, y pueden seleccionarse adecuadamente por un experto en la técnica. Las condiciones astringentes pueden seleccionarse para ser aproximadamente 5-10 °C menores que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm puede ser la temperatura (en una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la Tm, el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones astringentes pueden ser aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de ion sodio, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (p. ej., aproximadamente 10-50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (p. ej., mayores de aproximadamente 50 nucleótidos). Las condiciones astringentes también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes ejemplares incluyen las siguientes: formamida al 50%, 5xSSC, y SDS al 1%, incubación a 42 °C, o, 5xSSC, SDS al 1%, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2xSSC, y SDS al 0,1% a 65 °C. Sin embargo, varios factores distintos de la temperatura, tales como la concentración de sal, pueden influir en la astringencia de la hibridación y un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente los factores para conseguir una astringencia similar.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “valor de referencia” se refiere a un valor que se correlaciona estadísticamente con un resultado particular cuando se compara con el resultado de un ensayo. En realizaciones preferidas, el valor de referencia se determina a partir del análisis estadístico de estudios que comparan la expresión de microARN con resultados clínicos conocidos. El valor de referencia puede ser un valor de puntuación umbral o un valor de puntuación de corte. Típicamente, un valor de referencia será un umbral por encima (o por debajo) del cual es más probable un resultado y por debajo del cual es más probable un umbral alternativo.

En una realización, un nivel de referencia puede ser uno o más niveles de miARN circulante expresados como un promedio del nivel del miARN circulante de muestras tomadas de una población control de sujetos sanos (sin enfermedad). En otra realización, el nivel de referencia puede ser el nivel en el mismo sujeto en un momento diferente, p. ej., antes del presente ensayo, tal como el nivel determinado antes de que el sujeto desarrolle la enfermedad o antes de iniciar la terapia. En general, las muestras se normalizan por un factor común. Por ejemplo, las muestras de

fluido corporal acelular se normalizan por el volumen de fluido corporal y las muestras que contienen células se normalizan por el contenido de proteínas o el recuento de células. Las muestras de ácido nucleico también pueden normalizarse respecto a un ácido nucleico interno control.

Como se describe en la presente memoria, la diferencia del nivel de uno o más polipéptidos o ARN (ARNm o microARN) es indicativa de una enfermedad o de un estadio de la misma. La expresión "diferencia del nivel" se refiere a diferencias en la cantidad de un marcador particular, tal como un ácido nucleico, en una muestra comparado con un nivel control o de referencia. Por ejemplo, la cantidad de un biomarcador particular puede estar presente en una cantidad elevada o en una cantidad disminuida en muestras de pacientes con una enfermedad neoplásica comparado con un nivel de referencia. En una realización, una "diferencia de un nivel" puede ser una diferencia entre la cantidad de un biomarcador particular presente en una muestra comparado con un control (p. ej., valor de referencia) de al menos aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80% 100%, 150%, 200%, o más. En una realización, una "diferencia de un nivel" puede ser una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de un biomarcador presente en una muestra comparado con un control. Por ejemplo, una diferencia puede ser estadísticamente significativa si el nivel medido del biomarcador se encuentra fuera de aproximadamente 1,0 desviación estándar, aproximadamente 1,5 desviaciones estándar, aproximadamente 2,0 desviaciones estándar, o aproximadamente 2,5 desviaciones estándar de la media de cualquier grupo control o de referencia. Con respecto a la medición de miARN, el nivel puede medirse a partir de PCR en tiempo real como el valor Ct, que puede normalizarse a un valor ACt como se describe en los Ejemplos más adelante.

Cribado de fármacos

La invención proporciona un método para identificar un compuesto que es útil para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión celular, o angiogénesis metastásica.

Los compuestos candidatos que se van a cribar (p. ej., proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, anticuerpos, moléculas pequeñas, u otros fármacos) pueden obtenerse usando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica. Dichas bibliotecas incluyen: bibliotecas de péptidos, bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con un nuevo núcleo no peptídico que es resistente a la degradación enzimática); bibliotecas en fase sólida o fase de disolución paralelas espacialmente abordables; bibliotecas sintéticas obtenidas por desconvolución o selección por cromatografía de afinidad; y las bibliotecas "un lecho un compuesto". Véanse, p. ej., Zuckermann *et al.* 1994, J. Med. Chem. 37:2678-2685; y Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145. Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse, p. ej., en DeWitt *et al*, 1993, PNAS USA 90:6909; Erb *et al*, 1994, PNAS USA 91: 11422; Zuckermann *et al*, 1994, J. Med. Chem. 37:2678; Cho *et al*, 1993, Science 261: 1303; Carrell *et al*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell *et al*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop *et al*, 1994 J. Med. Chem. 37: 1233. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (p. ej., Houghten, 1992, Biotechniques 13:412-421), o en lechos (Lam, 1991, Nature 354:82-84), chips (Fodor, 1993, Nature 364:555-556), bacterias (Patente de EE.UU. No. 5.223.409), esporas (Patente de EE.UU. No. 5.223.409), plásmidos (Cull *et al*, 1992, PNAS USA 89: 1865-1869), o fagos (Scott y Smith 1990, Science 249:386-390; Devlin, 1990, Science 249:404-406; Cwirla *et al*, 1990, PNAS USA 87:6378-6382; Felici 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310; y Patente de EE.UU. No. 5.223.409).

Para identificar un compuesto útil, se puede poner en contacto un compuesto de ensayo con un sistema que contiene células de ensayo que expresan un gen informador codificado por un ácido nucleico unido de forma operativa a un promotor de un gen marcador seleccionado de los promotores o supresores de metástasis mencionados anteriormente. El sistema puede ser un modelo de una línea celular *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Las células pueden expresar de forma natural el gen, o pueden modificarse para expresar un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico recombinante puede contener un ácido nucleico que codifica un polipéptido informador con un promotor heterólogo. Después, se mide el nivel de expresión del miARN, polipéptido, o polipéptido informador.

Para el polipéptido, el nivel de expresión puede determinarse bien a nivel de ARNm o a nivel de proteína. Los métodos para medir los niveles de ARNm en una célula, una muestra de tejido, o un fluido corporal son muy conocidos en la técnica. Para medir los niveles de ARNm, las células pueden lisarse y los niveles de ARNm en los lisados o en ARN purificado o semipurificado de los lisados pueden determinarse por, p. ej., ensayos de hibridación (usando sondas de ADN o ARN específicas de gen marcadas de forma detectable) y RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa (usando cebadores específicos de gen apropiados). Alternativamente, pueden llevarse a cabo ensayos cuantitativos o semicuantitativos de hibridación *in situ* usando secciones de tejido o suspensiones de células no lisadas, y sondas de ADN o ARN marcadas de forma detectable (p. ej., fluorescentes o enzimas). Los métodos adicionales de cuantificación de ARNm incluyen el ensayo de protección de ARN (RPA) y SAGE. Los métodos para medir los niveles de proteína en una muestra de células o tejido también son conocidos en la técnica.

Para determinar la efectividad de un compuesto candidato para tratar melanoma o inhibir el reclutamiento endotelial, invasión celular, o angiogénesis metastásica, se puede comparar el nivel obtenido de la manera descrita anteriormente con un nivel control (p. ej., uno obtenido en ausencia del compuesto candidato). El compuesto se identifica como efectivo si (i) el nivel de un supresor de la metástasis es menor que un valor control o de referencia o (ii) el nivel de un

promotor de la metástasis es mayor que el valor control o de referencia. Se puede verificar adicionalmente la eficacia de un compuesto así identificado usando el modelo de cultivo celular *in vitro* o un modelo animal *in vivo* como se describe en el ejemplo más adelante.

Ejemplos

Ejemplo 1 Materiales y Métodos

Este ejemplo describe los materiales y métodos usados en los Ejemplos 2-11 más adelante.

Compuestos

Tabla 3 Nombres de los compuestos

No. del compuesto	Nombre del compuesto
1	T0901317
2	GW3965
3	LXR-623
12	WO-2010-0138598 Ej. 9 o WO-201000138598
25	SB742881
38	WO-2007-002563 Ej. 19 o WO-2007-002563

Estudios en animales

Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en The Rockefeller University. Se usaron ratones de 6-8-semanas de edad con concordancia de edad y de sexo para los ensayos de crecimiento tumoral primario y metástasis como se ha descrito previamente (Minn et al, 2005; Tavazoie *et al.*, 2008). Véanse los Procedimientos Experimentales Extendidos.

Cultivo celular

Todas las líneas celulares de cáncer se cultivaron como se ha descrito previamente (Tavazoie et al, 2008). Se mantuvieron células 293T y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en condiciones estándar. En los Procedimientos Experimentales Extendidos se detallan los estudios de inactivación/sobreexpresión de miARN y génicos en líneas celulares y los ensayos funcionales *in vitro*.

Hibridación en micromatriz

Con el fin de identificar los miARN desrregulados en derivados altamente metastásicas, se enriquecieron ARN pequeños del ARN total derivado de las líneas celulares MeWo y A375 y se perfilaron por LC sciences. Con el fin de identificar dianas génicas potenciales de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908, se marcó ARN total de líneas celulares MeWo y se hibridó en matrices de Expresión BeadChip Illumina HT-12 v3 por la instalación de genómica central de The Rockefeller University. Véanse los Procedimientos Experimentales Extendidos para los umbrales y criterios usados para llegar a las dianas miARN y ARNm.

Análisis de la expresión de miARN en lesiones cutáneas de melanoma humano

Todas las muestras clínicas humanas usadas en este estudio se obtuvieron, procesaron, y analizaron según las directrices de IRB. El ARN total se extrajo de secciones transversales incluidas en parafina de lesiones cutáneas de melanoma primario reseccionadas previamente de pacientes en MSKCC, y se analizaron los niveles de expresión de miARN específicos de una forma ciega usando ensayos de miARN TaqMan (Applied Biosystems). Se generaron curvas de Kaplan-Meier que representan los datos de supervivencia sin metástasis de cada paciente como una función de los valores de expresión de miARN en tumor primario usando el paquete de software GraphPad Prism.

Terapia con LNA in vivo

Después de la inyección en la vena de la cola de 4 x 10^4 células MeWo-LM2, los ratones NOD-SCID se trataron por vía intravenosa dos veces a la semana durante cuatro semanas con LNA antisentido optimizados *in vivo* (Exiqon) frente a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 a una dosis combinatoria de 12,5 mg/kg administrada en 0,1 ml de PBS.

Histología

Para la visualización macroscópica gruesa de los nódulos metastásicos, se tiñeron con H y E secciones de tejido pulmonar con un grosor de 5 µm. Para el análisis *in vivo* del contenido endotelial, se tiñeron doblemente secciones pulmonares con anticuerpos frente a MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, IA), que marca células endoteliales de ratón, y vimentina humana (Vector Laboratories), que marca células de melanoma humano. Véanse los Procedimientos Experimentales Extendidos.

Análisis de los datos

Todos los datos se representan como media ± SEM. Se usó el ensayo de Kolmogorov-Smirnov para determinar la significancia de las diferencias en las distribuciones acumulativas de densidad de vasos sanguíneos metastásicos. El poder de pronóstico de los miARN para predecir los resultados metastásicos se ensayó para determinar la significancia usando el ensayo de rango logarítmico de Mantel-Cox. Se usó el ensayo de la t de Mann- Whitney de una vía para determinar los valores de significancia para mediciones de bioluminiscencia no Gaussianas. Para todas las demás comparaciones, se usó el ensayo de la t de student de una vía. Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Ensayos in vivo de selección, metástasis experimental, y crecimiento tumoral primario

Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en The Rockefeller University. Para generar múltiples derivados metastásicos de dos líneas celulares de melanoma humano independientes, se realizó selección *in vivo* como se ha descrito previamente (Minn et al, 2005 Nature *436*, 518-524; Pollack y Fidler, 1982 J. Natl. Cancer Inst. *69*, 137-141). Brevemente, se resuspendieron 1 x 10^6 células parentales de melanoma pigmentadas MeWo o no pigmentadas A375 en 0,1 ml de PBS y se inyectaron por vía intravenosa en ratones NOD-SCID inmunocomprometidos de 6-8-semanas de edad. Después de la formación de metástasis pulmonares, se disociaron los nódulos y las células se propagaron *in vitro*, dando lugar a una primera generación de derivados metastásicos pulmonares (LM1). Las células LM1 se sometieron entonces a otra ronda de selección *in vivo* inyectando 2 x 10^5 células a través de la vena de la cola en ratones NOD-SCID, dando lugar a nódulos metastásicos, cuya disociación posterior rindió una segunda generación de derivados metastásicos pulmonares (LM2). Para la línea celular A375, se realizó una tercera ronda de selección *in vivo*, dando lugar a los derivados A375-LM3 altamente metastásicos.

Con el fin de monitorizar las metástasis *in vivo* a través de análisis de imagen bioluminiscente, las células parentales A375 y MeWo y sus derivados metastásicos se transdujeron con una construcción retroviral que expresa un informador luciferasa (Ponomarev *et al.*, 2004 Eur J Nucl Med Mol Imaging *31*, 740-751). Para todos los experimentos de metástasis, se monitorizó la colonización pulmonar o sistémica con el tiempo y se cuantificó mediante análisis de imagen bioluminiscente no invasiva como se ha descrito previamente (Minn *et al.*, 2005). Para determinar si la selección *in vivo* se había conseguido, se resuspendieron 4 x 10^4 células parentales MeWo o células MeWo-LM2 y 1 x 10^5 células parentales A375 o células A375-LM3 en 0,1 ml de PBS y se inyectaron a través de la vena de la cola en ratones NOD-SCID de 6-8 semanas de edad. Para los ensayos de metástasis experimental que ensayan los efectos de los miARN posibles promotores en la colonización pulmonar, se resuspendieron 4 x 10^4 células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, miR-214, o una horquilla control, 4 x 10^4 células MeWo-LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control, y 2 x 10^5 células A375-LM3 inhibidas para miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control en 0,1 ml de PBS y se inyectaron en la vena de la cola de ratones NOD-SCID de 6-8 semanas de edad. Para los experimentos de epistasis, se inyectaron por vía intravenosa 1 x 10^5 células MeWo-LM2 que expresan un ARNsh dirigido a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control o ARNsi que inhibe LRP1 o una secuencia control en el entorno de la inhibición de miARN en ratones NOD-SCID de 6-8 semanas de edad. Para los experimentos de pretratamiento de ApoE, se incubaron células MeWo-LM2 en presencia de ApoE o BSA a 100 µg/ml a 37 °C. Después de 24 horas, se inyectaron 4 x 10^4 células a través de la vena de la cola en ratones NOD-SCID de 7 semanas de edad. Para determinar el efecto de pretratar células de melanoma altamente metastásicas con LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 en la metástasis, se transfectaron células MeWo-LM2 con cada LNA individualmente, una mezcla de LNA dirigidos a los tres miARN, o un LNA control. Después de 48 horas, se administraron por vía intravenosa 1 x 10^5 células, resuspendidas en 0,1 ml de PBS, en ratones NOD-SCID de 7 semanas de edad para los estudios de colonización metastásica de pulmón o a través de inyección intracardiaca en ratones desnudos atímicos de 7 semanas de edad para los ensayos de metástasis sistémica. Para determinar el efecto de la deleción genética de ApoE en la metástasis, se inyectó por vía intravenosa a ratones C57BL/6-WT o C57BL/6-ApoE-/- de 8 semanas de edad 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10. Para los estudios de crecimiento tumoral primario, se mezclaron 1 x 10^6 células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control 1:1 con matrigel y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco inferior derecho de ratones NOD-SCID inmunodeficientes de 6 semanas de edad. Los animales se palparon semanalmente

para detectar la formación de tumores, después de lo cual se midieron los tumores mensurables dos veces a la semana. El volumen tumoral se calculó como (diámetro pequeño)^2 x (diámetro grande)/2.

Inhibición del miARN lentiviral e inactivación génica

Se sembraron células 293T en una placa de 10 cm y se dejó que alcanzaran el 60% de confluencia. Antes de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio DMEM fresco sin antibióticos suplementado con FBS al 10%. Se cotransfectaron 6 µg de vector A, 12 µg de vector K, y 12 µg del miR-Zip apropiado (System Biosciences, Mountain View, CA) o construcción de plásmido ARNsh (MSKCC HTS Core Facility, Nueva York, NY) usando 60 µl de reactivo de transfección TransIT-293 (MIR 2700, Minis Bio LLC, Madison, WI). Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas, y el virus se recogió por centrifugación del medio celular durante 10 minutos a 2.000g seguido de la filtración del virus a través de un filtro de 0,45 µm. Se transdujeron 1 x 10^5 células cancerosas con 2 ml del virus apropiado en presencia de 10 µg/ml de polibreno (TR-1003-G, Millipore, Billerica, MA) durante 6 hrs. Después de 48 horas, se añadieron 2 µg/ml de puromicina (P8833, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) al medio celular para la selección lentiviral. Las células se mantuvieron en selección de puromicina durante 72 horas. Se usaron las siguientes secuencias de miR-Zip:

miR-Zip-199a-3p: 5'-

GATCCGACAGTAGCCTGCACATTAGTCACTTCCTGTCAGTAACCAATG

TGCAGACTACTGTTTTTTGAATT-3'

miR-Zip-199a-5p: 5'-

GATCCGCCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAG

TCTGAACACTGGGTTTTTGAATT-3'

miR-Zip-1908 5'-

GATCCGCGGCGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC

CC GCCGTTTTTGAATT-3'

Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:

shAPOE[1]:

5'CCGGGAAGGAGTTGAAGGCCTACAACTCGAGTTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

shAPOE[2]:

5'CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGC

TTTTT3'

shDNAJA4[1]:

5'CCGGGCGAGAAGTTTAAACTCATATCTCGAGATATGAGTTTAAACTTCTCGC

TTTTT3'

shDNAJA4[2]:

5'CCGGCCTCGACAGAAAGTGAGGATTCTCGAGAATCCTCACTTTCTGTCGAGG

TTTTT3'

miARN retroviral y sobreexpresión génica

Se cotransfectaron 6 µg de vector VSVG, 12 µg de vector Gag-Pol, y 12 µg de plásmido pBabe que contiene las secuencias codificadoras de ApoE humana, DNAJA4, o un vector vacío o miR-Vec que contiene la secuencia precursora de miR-199a, miR-214, miR-1908, o una horquilla control en células 293T confluentes al 60% usando 60 µl de reactivo de transfección TransIT-293. Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas, después de lo cual el virus se recogió y se transdujo en células cancerosas en presencia de 10 µg/ml de polibreno durante 6 horas. Después de 48 horas, se añadieron 2 µg/ml de puromicina o 10 µg/ml de blasticidina (15205, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) al medio celular para la selección retroviral. Las células se mantuvieron en selección de puromicina durante 72 horas o en selección de blasticidina durante 7 días. Se usaron los siguientes cebadores de clonación para la sobreexpresión de las secuencias codificadoras de ApoE y DNAJA4:

ApoE_CDS_Dir : 5'-TCATGAGGATCCATGAAGGTTCTGTGGGCT-3'

ApoE_CDS_Inv : 5'-TAGCAGAATTCTCAGTGATTGTCGCTGGG-3'

DNAJA4_CDS_Dir : 5'-ATCCCTGGATCCATGTGGGAAAGCCTGACCC-3'

DNAJA4_CDS_Inv : 5'-TACCATGTCGACTCATGCCGTCTGGCACTGC-3'

Inactivación de miARN basada en LNA

Se transfectaron LNA complementarios a miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908 maduros, o una secuencia control (426917-00, 426918-00, 426878-00, y 1990050, respectivamente; Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) a una concentración final de 50 nM en células MeWo-LM2 cancerosas confluentes al 50% cultivadas en medio sin antibióticos usando el reactivo de transfección lipofectamine™ 2000 (11668-09, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 8 horas, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco. Después de 48 horas, se inyectaron 1 x 10^5 células por vía intravenosa en ratones NOD-SCID para evaluar la colonización metastásica pulmonar o a través de inyección intracardiaca en ratones desnudos atímicos para evaluar la metástasis sistémica. Para los ensayos de invasión celular y reclutamiento endotelial *in vitro*, las células se usaron 96 horas después de la transfección.

Inactivación de ARNm basada en ARNsi

Se transfectaron ARNsi dirigidos a LRP1, LRP8, VLDLR, LDLR, o una secuencia control en células cancerosas o HUVEC a una concentración final de 100 nM usando el reactivo de transfección lipofectamine™ 2000. Después de 5 horas, el medio de transfección se reemplazó con medio fresco. Las células se sometieron a ensayos de invasión de matrigel y reclutamiento endotelial 96 horas después de la transfección. Las células transducidas con ARNsi dirigidos a LRP1 o una secuencia control en el entorno de inhibición de miARN se inyectaron a través de la vena de la cola para los ensayos de colonización pulmonar 72 horas después de la transfección. Los ARNsi control no dirigidos se obtuvieron de Dharmacon. Se usaron las siguientes secuencias diana de LRP1 y LRP8:

siLRP1[1]: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP1[2]: 5'-GCUAUGAGUUUAAGAAGUU-3';

siLRP8[1]: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP8[2]: 5'-GAACUAUUCACGCCUCAUC-3'.

Ensayo de proliferación celular

Para determinar los efectos de la sobreexpresión de miR-199a o miR-1908 y de la inhibición de miARN inducida por LNA combinatoria sobre la proliferación celular, se sembraron 2,5 x 10^4 células en triplicado en placas de 6 pocillos, y las células viables se contaron después de 5 días. Para evaluar los efectos de la adición de ApoE recombinante en la proliferación de células de melanoma o células endoteliales, se incubaron 3 x 10^4 células de melanoma MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE (100 µM) o BSA (100 µM). Las células viables se contaron después de 8, 24, 48, 72, y 120 horas.

Ensayo de invasión de matrigel

Se privaron de suero células cancerosas en medio basado en DMEM con FBS al 0,2% durante 12 horas. Se pre-equilibraron cámaras de invasión trans-well (354480, BD Biosciences, Bedford, MA) antes de empezar el ensayo por la adición de 0,5 ml de medio de privación a las cámaras superior e inferior. Después de 30 minutos, el medio de la cámara superior se retiró, y se añadieron 0,5 ml de medio que contenía 1 x 10^5 células cancerosas a cada inserto

recubierto con matrigel y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Para los experimentos con anticuerpo neutralizante y/o proteína recombinante, se añadió anticuerpo/proteína recombinante a cada pocillo al inicio del ensayo a las siguientes concentraciones como se indica en las figuras: 5-40 µg/ml de anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa), 5-40 µg/ml de anti-IgG (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN), ApoE3 humana recombinante 100 µM (4696, Bio Vision, Mountain View, CA), y BSA 100 µM (A2153, Sigma- Aldrich). Después de la compleción del ensayo, los insertos recubiertos con matrigel se lavaron con PBS, las células en el lado superior de cada inserto se rasparon, y los insertos se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. Los insertos se cortaron entonces y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje VectaShield que contenía DAPI (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento de 5X, tomando tres imágenes representativas para cada inserto. El número de células invadidas se cuantificó usando ImageJ (NIH).

Ensayo de reclutamiento endotelial

Se sembraron 5 x 10^4 células cancerosas en placas de 24 pocillos aproximadamente 24 horas antes del inicio del ensayo. Se crecieron HUVEC hasta el 80% de confluencia y se privaron de suero en medio EGM-2 suplementado con FBS al 0,2% durante 16 horas. Las HUVEC se pulsaron entonces con tinción Cell Tracker Red CMTPX (C34552, Invitrogen) durante 45 minutos. Mientras tanto, las células cancerosas se lavaron con PBS, se añadieron 0,5 ml de medio EGM-2 con FBS al 0,2 % a cada pocillo, y un inserto de 3,0 µm HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon, San José, CA) se puso en cada pocillo. Se sembraron 1 x 10^5 HUVEC, resuspendidas en 0,5 ml de medio de privación, en cada inserto trans-well, y se dejó que procediera el ensayo de reclutamiento durante 16-18 horas a 37 °C. Para los experimentos con anticuerpo neutralizante y/o proteína recombinante, se añadió anticuerpo/proteína a cada pocillo a la concentración apropiada como se indica en las figuras: 40 µg/ml de anti-ApoE 1D7, 40 µg/ml de anti-IgG, rhApoE3 100 µM, y BSA 100 µM. Después de la compleción del ensayo, los insertos se procesaron y se analizaron como se describe para el ensayo de invasión de matrigel anterior (Véase el Ensayo de Invasión de Matrigel).

Ensayo de migración endotelial

Se pulsaron HUVEC privadas de suero con tinción Cell Tracker Red CMTPX durante 45 minutos y se sembraron en insertos trans-well HTS Fluoroblock a una concentración de 1 x 10^5 HUVEC en 0,5 ml de medio de privación para cada inserto. El ensayo se dejó proceder durante 16-18 horas a 37 °C, y los insertos se procesaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente (Véase el Ensayo de Invasión de Matrigel).

Ensayo de quimiotaxis

Se privaron de suero HUVEC en medio EGM-2 con FBS al 0,2% durante 16 horas y se marcaron con tinción Cell Tracker Red CMTPX durante 45 minutos. Mientras tanto, se mezclaron las cantidades indicadas (1-5 µg) de ApoE3 humana recombinante o BSA con 250 µl de matrigel (356231, BD Biosciences) y se dejó que se solidificara en la parte inferior de una placa de 24 pocillos durante 30 min. Se añadieron entonces 250 µl de medio de HUVEC EGM-2 que contenía FBS al 0,2% a cada pocillo recubierto con matrigel, y se ajustaron insertos de 3,0 µM HTS Fluoroblock en cada pocillo. Se sembraron 1 x 10^5 HUVEC, resuspendidas en 0,5 ml de medio de privación, en cada inserto y se dejó que migraran a lo largo del gradiente de matrigel durante 16-18 horas a 37 °C. Después de la compleción del ensayo, los insertos se montaron en portaobjetos y se analizaron como se ha descrito anteriormente (Véase el Ensayo de Invasión de Matrigel).

Ensayo de adhesión endotelial

Se sembraron HUVEC en placas de 6 pocillos y se dejó que formaran monocapas. Las células cancerosas se privaron de suero en medio basado en DMEM con FBS al 0,2% durante 30 minutos y se pulsaron con tinción Cell Tracker Green CMFDA (C7025, Invitrogen) durante 45 minutos. Se sembraron 2 x 10^5 células cancerosas, resuspendidas en 0,5 ml de medio de privación, en cada monocapa endotelial. Se dejó que las células cancerosas se adhirieran a las monocapas de HUVEC durante 30 minutos a 37 °C. Las monocapas endoteliales se lavaron entonces suavemente con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. Cada pocillo se recubrió entonces con PBS, y se tomaron 8 imágenes para cada monocapa endotelial usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento de 10X. El número de células cancerosas que se adhirieron a HUVEC se cuantificó usando ImageJ.

Ensayo de Anoikis

Se sembraron 1 x 10^6 células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en placas de baja adherencia que contenían medio celular suplementado con metilcelulosa al 0,2%. Después de 48 horas en suspensión, los números de células muertas y viables se contaron usando azul de tripán.

Ensayo de privación de suero

Para determinar los efectos de miR-199a y miR-1908 en la capacidad de privación de suero de células de melanoma, se sembraron 1 x 10^5 células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en cuadruplicado en placas de 6 pocillos y se incubaron en medio basado en DMEM de privación con FBS al 0,2% durante 48 horas, después de lo cual el número de células viables se contó usando azul de tripán. Para determinar el efecto de la adición de ApoE3 recombinante en la supervivencia de células de melanoma o células endoteliales en condiciones de privación de suero, se incubaron 3 x 10^4 células MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE3 (100 µM) o BSA (100 µM) en condiciones de bajo contenido de suero (FBS al 0,2%). El número de células viables se contó después de 8, 16, y 24 horas.

Ensayo de formación de colonias

Se sembraron cincuenta células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en cuadruplicado en placas de 6 cm. Después de dos semanas, las células se lavaron con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 6%, y se tiñeron con cristal violeta al 0,5%. Se contó el número de colonias con tinción positiva.

Hibridación en micromatriz de miARN

Para la identificación de miARN que muestran una expresión desregulada en derivados de líneas celulares de melanoma altamente metastásicos, el ARN total de múltiples derivados metastásicos independientes y de sus poblaciones de células parentales MeWo y A375 respectivas se usó para enriquecer para ARN pequeños que se marcaron entonces y se hibridaron en plataformas de micromatrices microfluidas personalizadas por LC sciences. Las matrices se diseñaron para detectar 894 miARN maduros correspondientes a los transcritos de miARN listados en Sanger miRBase Release 13.0. De todas las sondas analizadas, aquellas correspondientes a 169 miARN rindieron una señal por encima del umbral de fondo en las múltiples líneas celulares analizadas. Las intensidades de las señales brutas, correspondientes a la hibridación de la sonda, se normalizaron para la mediana para cada línea celular. Se usó un umbral de 2 veces o más de regulación al alza de los valores de expresión normalizados para la mediana con el fin de identificar miARN inducidos comúnmente en múltiples derivados metastásicos para dos líneas celulares de melanoma humano independientes.

Predicción de dianas génicas basada en micromatriz para miR-199a y miR-1908

Con el fin de identificar genes potenciales a los que están dirigidos miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908, se extrajo el ARN total de líneas celulares MeWo con pérdida o ganancia de función de cada miARN y se envió a la instalación central de genómica The Rockefeller University para hibridación en micromatrices de Expresión Illumina HT-12 v3 BeadChip. Las intensidades de las señales brutas, correspondientes a la hibridación de la sonda, se normalizaron para la mediana para cada muestra de la línea celular. Se generaron tres conjuntos de comparaciones de perfiles de micromatriz: (1) células control MeWo respecto a células MeWo que sobreexpresan miR-199a o miR-1908, (2) células control MeWo-LM2 respecto a células MeWo-LM2 que expresan una horquilla corta (miR-Zip) dirigida a miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908, y (3) células parentales MeWo respecto a células MeWo-LM2. Sobre la base de los valores de expresión normalizados para la mediana de estas matrices, se usaron los siguientes criterios para llegar a posibles genes diana comunes para miR-199a y miR-1908: (1) Genes regulados a la baja más de 1,5 veces después de la sobreexpresión individual de cada miR-199a y miR-1908, (2) Genes regulados al alza más de 1,5 veces después de la inhibición bien de ambos de miR-199a-3p y miR-1908 o ambos de miR-199a-5p y miR-1908, y (3) genes regulados a la baja más de 1,5 veces en células LM2, que expresan niveles fisiológicamente mayores de los tres miARN, respecto a células parentales MeWo.

Análisis de la expresión de miARN y ARNm en líneas celulares

Se extrajo el ARN total de varias líneas celulares usando el kit miRvana (AM 1560, Applied Biosystems, Austin, TX). Los niveles de expresión de miARN maduros se cuantificaron usando el ensayo de expresión de miARN Taqman (4427975-0002228, Applied Biosystems). Se usó RNU44 como un control endógeno para la normalización. Para los análisis de la expresión de ARNm, se transcribieron de forma inversa 600 ng de ARN total usando el kit de Síntesis de Primera Cadena de ADNc (18080-051, Invitrogen), y se mezclaron entonces aproximadamente 200 ng del ADNc resultante con Mezcla Maestra de PCR SYBR verde (4309155, Applied Biosystems) y los cebadores apropiados. Cada reacción se realizó en cuadruplicado, y la expresión de ARNm se cuantificó realizando amplificación por PCR en tiempo real usando un Sistema de PCR en Tiempo Real ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Se usó GAPDH como un control endógeno para la normalización. Se usaron los siguientes cebadores:

ApoE_Dir : 5'-TGGGTCGCTTTTGGGATTAC-3'

ApoE_Inv : 5'-TTCAACTCCTTCATGGTCTCG-3'

DNAJA4_Dir : 5'-CCAGCTTCTCTTCACCCATG-3'

DNAJA4_Inv :5'-GCCAATTTCTTCGTGACTCC-3'

GAPDH_Dir : 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

GAPDH_Inv : 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

LRP1_Dir : 5'-TTTAACAGCACCGAGTACCAG-3'

LRP1_Inv : 5'CAGGCAGATGTCAGAGCAG-3'

LRP8_Dir : 5'-GCTACCCTGGCTACGAGATG-3'

LRP8_Inv : 5'-GATTAGGGATGGGCTCTTGC-3'

ELISA

Se preparó medio condicionado de células cancerosas incubando las células en medio de privación basado en DMEM con FBS al 0,2% durante 24 horas. Los niveles de ApoE en el medio condicionado se determinaron usando el kit de ELISA para APOE (IRAPKT031, Innovative Research, Novi, Michigan).

Ensayos de informador con luciferasa

Los ensayos de informador con luciferasa heteróloga se realizaron como se ha descrito previamente (Tavazoie et al, 2008). Brevemente, se clonaron 3'UTR y CDS de ApoE y DNAJA4 de longitud completa en 3' de un informador de luciferasa de renilla en el vector informador de luciferasa dual psiCheck2 (C8021, Promega, Madison, WI). Se transfectaron 5 x 10^4 células MeWo parentales, células MeWo-LM2, células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control, y células MeWo-LM2 que expresan una horquilla miR-Zip dirigida a miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control con 100 ng de las construcciones de informador específico respectivas usando el reactivo de transfección TransiT-293. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron, y la relación de expresión de luciferasa de renilla a luciérnaga se determinó usando el ensayo de luciferasa dual (E1910, Promega). Se identificaron los posibles sitios de unión de miRNA en cada construcción diana por alineamiento con las secuencias de siembra de miARN complementarias (miR-199a-3p: 5'-CAGUAGUC-3'; miR-199a-5p: 5'-CCAGUGUU-3'; miR-1908: 5'- GGCGGGGA-3'). Los sitios complementarios de miARN en cada construcción diana se mutaron usando el kit de Mutagénesis Dirigida a Múltiples Sitios QuickChange (200514, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Sobre la base del análisis de la complementariedad de la secuencia de siembre de miARN, la CDS de ApoE se mutó en la posición 141 (CTG a ACT), la 3'UTR de ApoE se mutó en las posiciones 83 (GCC a ATA) y 98 (CTG a ACA), la CDS de DNAJA4 se mutó en las posiciones 373 (CGC a TAT) y 917 (CTG a AGA), y la 3'UTR de DNAJA4 se mutó en las posiciones 576 (CTG a ACA), 1096 (CTG a TCT), 1396 (CGC a TGT), y 1596 (CTG a TGT). Se usaron los siguientes cebadores para clonar las 3'UTR y CDS de ApoE y DNAJA4:

ApoE_CDS_Dir : 5'-AGTACCTCGAGGGGATCCTTGAGTCCTACTC-3'

APOE_CDS_Inv : 5'-TAATTGCGGCCGCTCAGACAGTGTCTGCACCCAG-3'

DNAJA4_CDS_Dir : 5'-TAATATCTCGAGATGTGGGAAAGCCTGACCC-3'

DNAJA4_CDS_Inv : 5'-CAATTGCGGCCGCTCATGCCGTCTGGCACTGC-3'

APOE_3'UTR_Dir : 5'-TTAGCCTCGAGACGCCGAAGCCTGCAGCCA-3'

APOE_3'UTR_Inv : 5'-TTACTGCGGCCGCTGCGTGAAACTTGGTGAATCTT-3'

DNAJA4_3'UTR_Dir : 5'-TAATATCTCGAGCGTGGTGCGGGGCAGCGT-3'

DNAJA4_3'UTR_Inv : 5'-CAATTGCGGCCGCTTATCTCTCATACCAGCTCAAT-3'

Se usaron los siguientes cebadores para mutagenizar los sitios de unión de miARN en cada diana:

APOE_CDS_mut: 5'-

GCCAGCGCTGGGAACTGGCAACTGGTCGCTTTTGGGATTACCT-3'

APOE_3'UTR_mut1: 5'-

CAGCGGGAGACCCTGTCCCCATACCAGCCGTCCTCCTGGGGTG-3'

APOE_3'UTR_mut2: 5'-

TCCCCGCCCCAGCCGTCCTCACAGGGTGGACCCTAGTTTAATA-3'

DNAJA4_CDS_mut1: 5'-

GGGATCGGTGGAGAAGTGCCTATTGTGCAAGGGGCGGGGGATG-3'

DNAJA4_CDS_mut2: 5'-

GTAGGGGGCGGGGAACGTGTTATCCGTGAAGAGGTGGCTAGGG-3'

DNAJA4_3'UTR_mut1: 5'-

CAGGGCCAACTTAGTTCCTAACATTCTGTGCCCTTCAGTGGAT-3'

DNAJA4_3'UTR_mut2: 5'-

ACAGTTTGTATGGACTACTATCTTAAATTATAGCTTGTTTGGA-3'

DNAJA4_3'UTR_mut3: 5'-

TAATTATTGCTAAAGAACTATGTTTTAGTTGGTAATGGTGTAA-3'

DNAJA4_3'UTR_mut4: 5'-

CAGCTGCACGGACCAGGTTCCATAAAAACATTGCCAGCTAGTGAG-3'

Análisis de la expresión de miARN en lesiones cutáneas de melanoma humano

Todas las muestras clínicas humanas usadas en este estudio se obtuvieron, se procesaron y se analizaron de acuerdo con las directrices institucionales de IRB. Se obtuvieron secciones transversales incluidas en parafina de lesiones cutáneas de melanoma humano primario de 71 pacientes humanos de MSKCC. Las muestras se desparafinaron por cinco lavados consecutivos con xileno (5 minutos cada uno). Después de la desparafinación, la región que contenía la malignidad se identificó por tinción con H y E, se diseccionó, y se extrajo de ella el ARN total usando el kit de Aislamiento de Ácido Nucleico Total RecoverAll (AM1975, Applied Biosystems). Los niveles de expresión de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 maduro en cada muestra se cuantificaron de una forma ciega usando el ensayo de miARN Taqman. Se usó RNU44 como un control endógeno para la normalización. Los niveles de expresión de cada miARN se compararon entre melanomas primarios con propensión a metastatizar y melanomas primarios que no metastatizaban. Se representaron curvas de Kaplan-Meier usando los datos de supervivencia sin metástasis de los pacientes como una función de los niveles de expresión para cada miARN en el tumor de cada paciente. La recurrencia metastásica a sitios tales como pulmón, cerebro, hueso, y tejido blando se documentó previamente y se dejó para un análisis retrospectivo de la relación entre los niveles de expresión de los ARNmi identificados y la recurrencia metastásica.

Histología

Se perfundieron animales con PBS seguido de fijación con paraformaldehído al 4% infundido mediante inyección intracardiaca y posteriormente intratraqueal. Los pulmones se seccionaron, se incubaron en paraformaldehído al 4% a 4 °C toda la noche, se incluyeron en parafina, y se cortaron en incrementos de grosor de 5 µm. Para la visualización

macroscópica gruesa de nódulos metastásicos, las secciones pulmonares se tiñeron con H y E. Para el análisis del contenido endotelial en nódulos metastásicos formados por células MeWo de melanoma humano en ratones, secciones de pulmón representativas se tiñeron doblemente con anticuerpos primarios frente a MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, IA), que marca células endoteliales de ratón, y vimentina humana (VP-V684, Vector Laboratories), que marca células de melanoma humano. Se usaron varios anticuerpos secundarios conjugados con la tinción Alexa Flour para detectar los anticuerpos primarios. Para determinar la densidad de los vasos sanguíneos en los nódulos metastásicos, se midió la fluorescencia usando un microscopio confocal de barrido láser Zeiss (LSM 510), y la señal de MECA-32 en cada nódulo metastásico, indicada sobre la base de la cotinción con vimentina humana, se cuantificó de una forma ciega usando ImageJ (NIH). Para el análisis del contenido endotelial en los nódulos metastásicos formados por células B16F10 de melanoma de ratón en ratones de tipo salvaje y con inactivación genética de ApoE, se tiñeron secciones de pulmón representativas para MECA-32, y la señal de MECA-32 en cada nódulo, demarcada sobre la base de la pigmentación celular, se cuantificó de una forma ciega. El área de los vasos colectiva, dada como el porcentaje del área cubierta por vasos sanguíneos respecto al área total de cada nódulo metastásico, se obtuvo por sustracción del fondo (radio de bola rodante de 1 píxel) y por el uso de un umbral predeterminado como un punto de corte. Un nódulo metastásico se definió como cualquier región con un área total mayor de 2.000 μm^2. Para nódulos grandes, se obtuvo un mínimo de cuatro imágenes representativas, y se calculó su densidad promedio de vasos sanguíneos.

Ensayo de tapón de matrigel in vivo

Se mezclaron 10 µg/ml de ApoE3 humana recombinante (4696, Bio Vision), 10 µg/ml de BSA (A2153, Sigma Aldrich), o 400 ng/ml de VEGF con matrigel (356231, BD Biosciences) como se indica. Se inyectaron por vía subcutánea 400 µl de matrigel que contenía las proteínas recombinantes indicadas justo por encima del flanco ventral de ratones NOD-SCID inmunocomprometidos. Los tapones se extrajeron en el día 3 después de la inyección y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 horas. Los tapones se incluyeron entonces en parafina y se seccionaron en incrementos de grosor de 5 µm. Las secciones transversales de los tapones se tiñeron inmunohistoquímicamente usando un anticuerpo primario frente al antígeno endotelial de ratón MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, IA), detectado por un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y visualizado posteriormente por oxidación con DAB. Para cuantificar el grado de invasión celular endotelial en cada tapón de matrigel, se contó el número de células endoteliales en 4-5 campos aleatorios para cada tapón, y se calculó el número promedio de células endoteliales por área de tapón dada.

Cultivo tisular

La línea de melanoma humano primario SK-Mel-334 se estableció a partir de una metástasis de tejido blando de un melanoma mutante *Braf* de un paciente en MSKCC. Después de una expansión mínima *in vitro*, las células se seleccionaron *in vivo* (Pollack y Fidler, 1982) para generar los derivados metastásicos en pulmón SK-Mel-334.2. El clon resistente a vemurafenib de SK-Mel-239 (CI) fue un obsequio de Poulikos Poulikakos (Mount Sinai Medical School) y la línea celular de melanoma murino primario *B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{-/-}$*; CDKN2A*$^{-/-}$ fue proporcionada generosamente por Marcus Rosenberg (Yale University). Todas las demás líneas celulares usadas se adquirieron en ATCC.

Elisa de ApoE

Los niveles extracelulares de ApoE en medio condicionado sin suero de células de melanoma tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 (1 µM cada uno) se cuantificaron usando el kit de ELISA de ApoE (Innovative Research) a las 72 horas después del tratamiento.

Western Blotting

Se homogeneizaron muestras de tejido pulmonar y cerebral de ratón en hielo en tampón RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Se homogeneizó el tejido adiposo de ratón en hielo en tampón TNET (Tris 1,5 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, tritón al 1%, inhibidores de proteasas). El lisado de proteínas total (2 µg) se separó por SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de PVDF, y se ensayó con anticuerpos anti-ApoE de ratón (ab20874, Abeam) y anti-tubulina α/β (2148, Cell Signaling).

Análisis de la expresión de ApoE en muestras clínicas de melanoma

La obtención, procesamiento, y análisis de todas las muestras clínicas se realizaron de acuerdo estrictamente con las directrices de IRB. Las lesiones cutáneas de melanoma primario se reseccionaron previamente de pacientes en MSKCC, se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina, y se seccionaron en cortes con un grosor de 5 µm. La expresión de la proteína ApoE se evaluó por análisis doble ciego de inmunohistoquímica usando el anticuerpo D6E10 anti-ApoE (abl906, Abcam).

Histoquímica

Los animales se perfundieron intracardiacamente con PBS seguido de paraformaldehído al 4% (PFA). Los pulmones fijados se incluyeron en parafina y se seccionaron en incrementos de grosor de 5 µm. Los nódulos metastásicos pulmonares macroscópicos se visualizaron por tinción con H y E. Para el análisis del contenido, proliferación, y apoptosis de células endoteliales en el tumor, se tiñeron secciones incluidas en parafina de tumor primario con anticuerpos frente a MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), KI-67 (abl5580, Abeam), y caspasa-3 escindida (9661, Cell Signaling), respectivamente.

Ensayos de metástasis en la vena de la cola

Las células de melanoma usadas para los ensayos de metástasis *in vivo* fueron transducidas con una construcción retroviral expresada de forma estable que codifica un gen informador de luciferasa (Ponomarev et al, 2004), lo que nos permite monitorizar la progresión de células de melanoma *in vivo* mediante análisis de imagen bioluminiscente. Se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola los siguientes números de células de melanoma, resuspendidas en 100 µL de PBS: 4 x 10^4 células MeWo, 2,5 x 10^5 células HT-144, 2 x 10^5 células SK-Mel-334.2, 5 x 10^4 células B16F10, y 1 x 10^5 células YUMM. Las células MeWo, HT-144, y SK-Mel-334.2 se inyectaron en ratones NOD scid con sexo concordante de 6-8 semanas de edad, mientras las células B16F10 y YUMM se inyectaron en ratones C57BL/6 con sexo concordante de 6-8 semanas de edad. En todos los experimentos que evaluaban los efectos de GW3965 sobre la formación de metástasis, los ratones se pretrataron con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 10 días. Para evaluar el efecto del tratamiento con GW3965 sobre las metástasis cerebrales, se inyectaron intracardiacamente 1 x 10^5 derivados metastásicos cerebrales MeWo en ratones desnudos atímicos. Inmediatamente después de la inyección, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). Para determinar si la administración oral de GW3965 puede inhibir la progresión de metástasis incipientes, se inyectaron por vía intravenosa a ratones NOD Scid 4 x 10^4 células MeWo y dejó que las células colonizaran los pulmones durante 42 días, después de lo cual los ratones se asignaron de manera ciega a una dieta control o una dieta suplementada con tratamiento con GW3965 (100 mg/kg).

Ensayos de metástasis ortotópicos

Para determinar el efecto del tratamiento con GW3965 en la colonización pulmonar por células de melanoma disociadas de un sitio ortotópico, se inyectaron por vía subcutánea 1 x 10^6 células MeWo que expresan un informador de luciferasa en ambos flancos inferiores de ratones NOD Scid. Después de la formación de tumores que tenían un volumen de ~300 mm^3, los tumores se escindieron y los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con tratamiento con GW3965 (100 mg/kg). Un mes después de la escisión de los tumores, se extrajeron los pulmones y se midió la colonización pulmonar por análisis de imagen bioluminiscente *ex vivo*. Para confirmar histológicamente el grado de colonización pulmonar del melanoma, los pulmones se fijaron entonces en PFA al 4% toda la noche, se incluyeron en parafina, se seccionaron en incrementos de 5 µm y se tiñeron para vimentina humana (VP-V684, Vector Laboratories).

Generación de células de melanoma resistentes a dacarbazina

Las células de melanoma de ratón B16F10 resistentes a dacarbazina se generaron por el cultivo continuo de las células en presencia de DTIC (D2390, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En primer lugar, las células se trataron con 500 µg/ml de DTIC durante una semana. Después de este tratamiento inicial con DTIC, se dejó que el resto de las células viables (~10%) se recuperara durante una semana, después de lo cual se añadieron 750 µg/ml de DTIC al medio celular durante 5 días. Posteriormente a este tratamiento con alta dosis, se dejó que las células se recuperaran en presencia de una dosis baja de DTIC (100 µg/ml) durante una semana. Las células se cultivaron entonces continuamente en medio celular que contenía 200 µg/ml de DTIC durante al menos un mes antes de injertar las células

en ratones. Se añadió DTIC al medio fresco de las células cancerosas cada 3 días. Para los experimentos de crecimiento tumoral, se inyectaron por vía subcutánea 5 x 10^4 células B16F10 parentales y resistentes a DTIC en el flanco inferior de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad. Después de la formación de tumores pequeños con un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se asignaron aleatoriamente a los siguientes grupos de tratamiento: (1) dieta control + vehículo, i.p.; (2) dieta control + DTIC i.p. (50 mg/kg); (3) dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) + vehículo i.p. El DTIC se disolvió en presencia de ácido cítrico (1:1 en peso) en agua y se administró diariamente por inyección intraperitoneal.

El clon de la línea celular de melanoma humano MeWo resistente a DTIC se generó después del tratamiento con DTIC de ratones que portaban tumores MeWo que tenían un volumen de 600-800 mm^3. Después de un encogimiento inicial de los tumores en respuesta a la dosificación diaria de DTIC (50 mg/kg, i.p.) durante las primeras dos semanas, los tumores desarrollaron eventualmente resistencia y continuaron su crecimiento, punto en el cual las células tumorales se disociaron y se estableció la línea celular MeWo resistente a DTIC. Las células se expandieron *in vitro* en presencia de DTIC (200 µg/ml) durante una semana, después de lo cual se volvieron a inyectar 5 x 10^5 células MeWo resistentes a DTIC en ratones Nod SCID gamma de 8 semanas de edad. Después del crecimiento de los tumores hasta un volumen de 5-10 mm^3, los ratones se asignaron de forma ciega a los siguientes grupos de tratamiento: (1) dieta control; (2) dieta control + DTIC (50 mg/kg); (3) dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). Para determinar el efecto de DTIC en el crecimiento tumoral por células MeWo parentales no seleccionadas, se inyectaron por vía subcutánea 5 x 10^5 células MeWo en ratones Nod SCID gamma, y los ratones se trataron con un vehículo control o DTIC (50 mg/kg) posteriormente a la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm^3. También se administró DTIC diariamente, como se ha descrito anteriormente, en ciclos que consistían en 5 tratamientos diarios consecutivos intercalados con intervalos de 2 días sin tratamiento. El crecimiento tumoral se midió dos veces a la semana.

Modelo iniciado genéticamente de progresión de melanoma

El modelo condicional de progresión de melanoma *Tyr::CreER; B-Ra*$^{V600E/+;}$ *Pten*$^{lox/+}$ */ Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+;}$ *Pten*$^{lox/lox}$ se ha establecido y caracterizado previamente por Dankort *et al.* (2009). Brevemente, se indujo melanoma en estos ratones a las 6 semanas de edad por la inyección intraperitoneal de 4-HT (H6278, 70% de isómero, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 25 mg/kg administrado en aceite de cacahuete en tres días consecutivos. La disolución madre de 4-HT se preparó disolviéndolo en EtOH al 100% a 50 mg/ml calentando a 45 °C durante 5 min y mezclando. Una vez disuelto, la disolución madre de 4-HT se diluyó entonces 10 veces en aceite de cacahuete, rindiendo una disolución de trabajo de 5 mg/ml de 4-HT que se inyectó entonces en los ratones. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron de forma ciega para recibir bien una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). Los ratones se examinaron tres veces a la semana para detectar la presencia y progresión de lesiones de melanoma. En el día 35, se recogieron muestras de piel dorsal de los ratones tratados control y tratados con GW3965, se fijaron en PFA al 4% y se fotografiaron a 10X. El porcentaje del área de lesión de melanoma pigmentada respecto al área de piel total se cuantificó usando ImageJ. Para los análisis de supervivencia, los ratones se monitorizaron diariamente para detectar la progresión de melanoma y se sometieron a eutanasia según una puntuación estándar de condición corporal, teniendo en cuenta los signos iniciales de estado moribundo y malestar asociados con la progresión de la carga de melanoma. Después de la muerte, se recogieron y se examinaron los pulmones, cerebros, y glándulas salivares para determinar la presencia de lesiones de melanoma macroscópicas.

Genotipado de los ratones

Todo el genotipado de los ratones se realizó usando condiciones estándar de PCR, según recomienda Jackson Labs. Se usaron los siguientes cebadores de genotipado para las respectivas reacciones de PCR:

Ratones *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+;}$ *Pten*$^{lox/+}$ y *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+;}$ *Pten*$^{lox/lox}$:

B-Raf Directo: 5'-TGA GTA TTT TTG TGG CAA CTG C-3'

B-Raf Inverso: 5'-CTC TGC TGG GAA AGC GGC-3'

Pten Directo: 5'-CAA GCA CTC TGC GAA CTG AG-3'

Pten Inverso: 5'-AAG TTT TTG AAG GCA AGA TGC-3'

Transgén *Cre* Directo: 5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3'

Transgén *Cre* Inverso: 5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'

Control Positivo Interno Directo: 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'

Control Positivo Interno Inverso: 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC C-3'

Ratones ApoE-/-:

Común Directo: 5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3'

Tipo salvaje Inverso: 5'-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3'

Mutante Inverso: 5'-GCC GCC CCG ACT GCA TCT-3'

Ratones *LXRα-/-*:

Común Directo: 5'-TCA GTG GAG GGA AGG AAA TG-3'

Tipo salvaje Inverso: 5'-TTC CTG CCC TGG ACA CTT AC-3'

Mutante Inverso: 5'-TTG TGC CCA GTC ATA GCC GAA T-3'

Ratones *LXRβ-/-*:

Común Directo: 5'-CCT TTT CTC CCT GAC ACC G-3'

Tipo salvaje Inverso: 5'-GCA TCC ATC TGG CAG GTT C-3'

Mutante Inverso: 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'

Ensayo de proliferación y viabilidad celular:

Para determinar los efectos de GW3965, T0901317, y Bexaroteno en el crecimiento celular *in vitro*, se sembraron 2,5 x 10^4 células de melanoma en triplicado en placas de 6 pocillos y se cultivaron en presencia de DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM cada uno. Después de 5 días, se contó el número de células viables y muertas usando la tinción de azul de tripán (72-57-1, Sigma- Aldrich), que marca selectivamente las células muertas.

Ensayo de invasión celular

El ensayo de invasión celular se realizó como se ha descrito previamente con detalle (Pencheva *et al.*, 2012) usando un sistema de cámara de invasión de matrigel trans-well (354480, BD Biosciences). Brevemente, varias células de melanoma se cultivaron en presencia de DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM durante 56 horas, después de lo cual las células de melanoma se cambiaron a medio de privación (FBS al 0,2%) durante 16 horas en presencia de cada fármaco. Después de la privación, las células se sembraron en insertos trans-well recubiertos con matrigel, y se dejó proceder el ensayo de invasión durante 24 horas a 37 °C. Para los experimentos con anticuerpos neutralizantes de ApoE, se añadieron 40 µg/ml de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40 µg/ml de anticuerpo anti-IgG control (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN) a cada inserto trans-well al inicio del ensayo.

Ensayo de reclutamiento endotelial

El ensayo de reclutamiento endotelial se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Pencheva et al, 2012; Png et al, 2012). Las células de melanoma se trataron con DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 µM durante 56 horas, después de lo cual se sembraron 5 x 10^4 células en una placa de 24 pocillos en presencia de cada fármaco y se dejó que se unieran durante 16 horas antes de empezar el ensayo. Las células HUVEC se privaron de suero toda la noche en medio EGM-2 que contenía FBS al 0,2%. Al día siguiente, se sembraron 1 x 10^5 células HUVEC en un inserto de migración trans-well de 3,0 µm HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon, San José, CA) ajustado en cada pocillo que contenía células cancerosas en la parte inferior. Se dejó que las células HUVEC migraran hacia las células cancerosas durante 20 horas a 37 °C, después de lo cual los insertos se procesaron como se ha descrito previamente (Pencheva *et al.*, 2012). Para los experimentos de neutralización con anticuerpo de ApoE, se añadieron 40 µg/ml de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40 µg/ml de anticuerpo anti-IgG control (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN) a cada inserto trans-well al inicio del ensayo.

Inactivación génica basada en ARNsh lentiviral

Se integraron ARNsh en partículas lentivirales que se prepararon por transfección de 6 µg de vector A, 12 µg de vector K, y 12 µg de plásmido de ARNsh en células de empaquetamiento HEK-293T, como se ha descrito previamente (Pencheva et al, 2012; Png et al, 2012). La transducción con ARNsh lentivirales se realizó en presencia de 10 µg/ml de polibreno (TR-1003-G, Millipore, Billerica, MA) durante 6 horas, como se ha descrito previamente (Pencheva et al, 2012). Las células se expandieron durante 72 horas después de la transducción y se realizó la selección lentiviral cultivando las células en presencia de 2 µg/ml de puromicina (P8833, Sigma-Aldrich) durante 72 horas.

Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:

Humana:

sh$_1$*LXRα*: 5'-
CCGGCCGACTGATGTTCCCACGGATCTCGAGATCCGTGGGAACATCAGTCGGT
TTTT-3'

sh$_2$*LXRα*: 5'-
CCGGGCAACTCAATGATGCCGAGTTCTCGAGAACTCGGCATCATTGAGTTGCT
TTTT-3'

sh$_1$*LXRβ*: 5'-
CCGGAGAGTGTATCACCTTCTTGAACTCGAGTTCAAGAAGGTGATACACTCTT
TTTT-3'

sh$_2$*LXRβ*: 5'-
CCGGGAAGGCATCCACTATCGAGATCTCGAGATCTCGATAGTGGATGCCTTCT
TTTT-3'

sh*ApoE*: 5'-
CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGCT
TTTT-3'

Ratón:

sh_m*LXRα*: 5'-
CCGGGCAACTCAATGATGCTGAGTTCTCGAGAACTCAGCATCATTGAGTTGCT
TTTT-3'

sh_m*LXRβ*: 5'-
CCGGTGAGATCATGTTGCTAGAAACCTCGAGGTTTCTAGCAACATGATCTCAT
TTTTG-3'

sh_m*ApoE*: 5'-
CCGGGAGGACACTATGACGGAAGTACTCGAGTACTTCCGTCATAGTGTCCTCT
TTTT-3'

Análisis de expresión génica por qRT-PCR:

Se extrajo ARN de lisados de células completas usando el kit de Purificación de ARN Total (17200, Norgen, Thorold, Canadá). Se transcribieron entonces de forma inversa 600 ng de ARN total en ADNc usando el kit de Síntesis de Primera Cadena de ADNc (18080-051, Invitrogen), y se realizó amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real como se ha descrito previamente (Pencheva *et al.*, 2012) usando un Sistema de PCR en Tiempo Real ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Austin, TX). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en cuadruplicado. La expresión génica se normalizó respecto a GAPDH, que se usó como un control endógeno. Se usaron los siguientes cebadores:

Humano:

ApoE Directo: 5'-TGGGTCGCTTTTGGGATTAC-3'

ApoE Inverso: 5'-TTCAACTCCTTCATGGTCTCG-3'

GAPDH Directo: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

GAPDH Inverso: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

*LXRα*_Dir: 5'-GTTATAACCGGGAAGACTTTGC-3'

*LXRα*_Inv: 5'-AAACTCGGCATC ATTGAGTTG-3'

*LXRβ*_Dir: 5'-TTTGAGGGTATTTGAGTAGCGG-3'

*LXRβ*_Inv: 5'-CTCTCGCGGAGTGAACTAC-3'

Ratón:

ApoE Directo: 5'-GACCCTGGAGGCTAAGGACT-3'

ApoE Inverso: 5'-AGAGCCTTCATCTTCGCAAT-3'

GAPDH Directo: 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAAT-3'

GAPDH Inverso: 5'-GCCTTCTCC ATGGTGGTGAA-3'

LXRα Directo: 5'-GCGCTCAGCTCTTGTCACT-3'

LXRα Inverso: 5'-CTCCAGCCACAAGGACATCT-3'

LXRβ Directo: 5' -GCTCTGCCTACATCGTGGTC-3'

LXRβ Inverso: 5'-CTCATGGCCCAGCATCTT-3'

ABCA1 Directo: 5'-ATGGAGCAGGGAAGACCAC-3'

ABCA1 Inverso: 5'-GTAGGCCGTGCCAGAAGTT-3'

Ensayo de la actividad del promotor de ApoE

El promotor de *ApoE*, que consiste en una secuencia que abarca 980 pares de bases en 5' y 93 pares de bases en 3' del gen *ApoE*, se clonó en un vector pGL3-Basic (El 751, Promega Corporation, Madison, WI) en 5' del gen de la luciferasa de luciérnaga usando las enzimas de restricción Nhel y Sacl. Después, se clonaron elementos multipotenciadores 1 (ME.1) y 2 (ME.2) directamente en 5' del promotor de *ApoE* usando las enzimas de restricción Mlul y Sacl. Para evaluar la activación transcripcional dirigida por el promotor de *ApoE* y ME.1/ME.2 por los agonistas de LXR, se sembraron 5 x 10^4 células MeWo en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se cotransfectaron 100 ng de la construcción pGL3-ME.1/ME.2-promotor de *ApoE* y 2 ng de la construcción pRL-CMV luciferasa de renilla (E2261, Promega) en células en presencia de DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μM, cada condición en cuadruplicado. Para evaluar la activación transcripcional por LXRα o LXRβ, se sembraron 5 x 10^4 células MeWo que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigido a *LXRα* o *LXRβ* en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se cotransfectaron 200 ng de la construcción pGL3-ME.1/ME.2-promotor de *ApoE* y 2 ng de pRL-CMV luciferasa de renilla en células en presencia de DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μM, cada condición en cuadruplicado. Después de 24 horas, las células se lisaron, y el lisado celular se analizó para determinar la actividad de luciferasa de luciérnaga y de renilla usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual (E1960, Promega) y un Lector de Microplacas Bio-Tek Synergy NEO. La señal de luciferasa de luciérnaga se normalizó respecto a la señal de luciferasa de renilla y todos los datos se expresan respecto a la relación de la actividad de luciferasa medida en las células control tratadas con DMSO.

Se usaron los siguientes cebadores de clonación:

Promotor de *ApoE* Directo: 5'-TCA TAG CTA GCG CAG AGC CAG GAT TCA CGC CCT G-3'

Promotor de *ApoE* Inverso: 5'-TGG TCC TCG AGG AAC CTT CAT CTT CCT GCC TGT GA-3'

ME.1 Directo: 5'-TAG TTA CGC GTA GCC CCC ATC TTT GCC-3'

ME.1 Inverso: 5'-AAT CAG CTA GCC CCT CAG CTG CAA AGC TC-3'

ME.2 Directo: 5'-TAG TTA CGC GTA GCC CCC TCT TTG CC-3'

ME.2 Inverso: 5'-AAT CAG CTA GCC CTT CAG CTG CAA AGC TCT G-3'

Histoquímica tumoral

Los tumores se escindieron de los ratones y se fijaron en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante 48 horas. Después, los tumores se incluyeron en parafina y se seccionaron en incrementos de grosor de 5 µm. Para el análisis del contenido de células endoteliales en los tumores, se tiñeron secciones tumorales con un anticuerpo primario frente al marcador de células endoteliales de ratón MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, IA) y se contratiñeron con la tinción nuclear DAPI. Para determinar la proliferación y apoptosis de las células tumorales, se tiñeron secciones tumorales con anticuerpos frente al marcador proliferativo Ki-67 (Abcam, abl5580, Cambridge, MA) y el marcador apoptótico caspasa-3 escindida (9661, Cell Signaling, Danvers, MA), respectivamente. Se usaron varios anticuerpos secundarios conjugados con la tinción Alexa Flour para detectar los anticuerpos primarios. La fluorescencia se midió usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento de 5X para la tinción de MECA-32 y Ki-67 y un aumento de 10X para la tinción de caspasa-3 escindida. La densidad del contenido de células endoteliales y la tasa de proliferación tumoral se cuantificaron calculando el porcentaje promedio de área con tinción positiva para MECA-32 o Ki- 67 del área tumoral total. La apoptosis tumoral se midió contando el número de células que expresan caspasa-3 escindida por área tumoral dada.

Análisis de la expresión de ApoE en lesiones de melanoma primario

Se reseccionaron muestras cutáneas de melanoma primario humano de pacientes con melanoma en MSKCC, se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina, y se seccionaron en incrementos de grosor de 5 µm. Para determinar la expresión de la proteína ApoE, las muestras se desparafinizaron en primer lugar por dos lavados consecutivos con xileno (5 minutos cada uno), y se rehidrataron en una serie de lavados con etanol (EtOH al 100%, 95%, 80%, y 70%). El antígeno ApoE se recuperó incubando las muestras en presencia de proteinasa K (5 µg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para inactivar la actividad peroxidasa endógena, los portaobjetos se incubaron en disolución de H_2O_2 al 3%. Los portaobjetos se bloquearon entonces en tres disoluciones de bloqueo consecutivas de Avidina, Biotina, y suero de caballo durante 15 min cada una a temperatura ambiente (SP-2001, Vector Laboratories, Burlingame, CA). ApoE se detectó por tinción con anticuerpo anti-ApoE D6E10 (abl908, Abcam), que se usó a una dilución 1:100 en PBS a 4 °C toda la noche. El anticuerpo primario fue reconocido entonces incubando los portaobjetos con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (PK- 4002, Vector Laboratories) y se expusieron a reacción de oxidación de DAB (SK-4105, Vector Laboratories). Se tomaron imágenes de los portaobjetos a un aumento de 10X y se analizaron de una manera doble ciega. La expresión de ApoE se cuantificó contando el número de células positivas para DAB y midiendo el área de la tinción de ApoE extracelular. La señal de la tinción de ApoE total se expresó como el porcentaje de área teñida por área tumoral dada, determinada sobre la base de portaobjetos tenidos con H y E concordantes para cada muestra. Se generaron curvas de Kaplan-Meier que representaban los tiempos de supervivencia sin metástasis de los pacientes representando los datos de supervivencia sin recidiva de cada paciente como una función de la expresión de ApoE en la lesión de melanoma primario en ese paciente. Los pacientes cuyos tumores tenían niveles de ApoE menores que la expresión mediana de ApoE de la población se clasificaron como negativos para ApoE, mientras los pacientes cuyos melanomas expresaron ApoE por encima de la mediana se clasificaron como positivos para ApoE. El historial documentado previamente de los pacientes de recurrencia metastásica a sitios tales como pulmón, cerebro, hueso, tejidos blandos y subcutáneos, y piel nos permitió determinar retrospectivamente la relación entre la expresión de ApoE en el sitio de melanoma primario y la recidiva metastásica.

Ejemplo 2 *Mir-1908, mir-199a-3p, y mir-199a-5p endógenos promueven la metástasis de melanoma humano*

Con el fin de identificar miRNA reguladores de la metástasis de melanoma, se utilizó la selección *in vivo* (Pollack y Fidler, 1982) con líneas celulares de melanoma humano MeWo pigmentadas y A375 no pigmentadas para generar múltiples derivados metastásicos de pulmón de segunda (LM2) y tercera generación (LM3). La comparación del potencial metastásico de las líneas MeWo- LM2 y A375-LM3 mostró que estos derivados metastatizan de una manera significativamente más eficiente que sus poblaciones parentales respectivas en los ensayos de colonización pulmonar (Figuras 12A-B). El perfilado de ARN pequeños basado en hibridación de 894 miARN maduros seguido de PCR cuantitativa de tallo-bucle (qRT-PCR) reveló que cuatro miARN (miR-1908, miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-214) estaban regulados al alza más de dos veces en múltiples derivados metastásicos A375 y MeWo respecto a sus células parentales respectivas (Figuras 1A-B, 12C). La inducción significativa de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-214, y miR-1908 en múltiples derivados metastásicos sugirió un papel promotor de metástasis para estos miARN. La transducción mediada por retrovirus y la sobreexpresión de los precursores para miR-199a-3p y miR-199a-5p (sobreexpresados concomitantemente como la horquilla miR-199a) y miR-1908 dieron lugar a un incremento robusto de la colonización pulmonar metastásica sobre la base tanto de la cuantificación de la señal de bioluminiscencia como de la histología pulmonar gruesa (Figura 1C, 12D; incremento de 9,64 veces, *P* = 0,016 para miR-1908; incremento de 8,62 veces, *P* = 0,028 para miR-199a), mientras la sobreexpresión de miR-214 no afectó significativamente la metástasis. De forma

importante, la sobreexpresión de cada miR-199a y miR-1908 incrementó el número de nódulos metastásicos formados (Figura 12E), lo que es consistente con un papel para estos miARN en el inicio metastásico. Estos descubrimientos también revelaron que miR-199a y miR-1908 eran suficientes para una colonización metastásica aumentada.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos para examinar si los niveles endógenos de estos miARN promueven la metástasis. Para este fin, se inhibieron miR-1908 y cada uno de los dos miARN que surgen de la horquilla miR-199a (miR-199a-3p y miR-199a-5p) en las células altamente metastásicas a través de tecnología miR-Zip. La inhibición individual de cada uno de estos miARN suprimió la colonización metastásica más de 7 veces (Figura 1D; $P = 0,047$ para la inhibición de miR-1908; $P = 0,010$ para la inhibición de miR-199a-3p; $P = 0,015$ para la inhibición de miR-199a-5p) y disminuyó dramáticamente el número de nódulos metastásicos formados (Figura 12F).

Para determinar si estos miARN también promueven la metástasis en una línea celular independiente, su expresión se silenció en la línea celular derivada metastásica de A375. De hecho, la inhibición de miR-1908, miR-199a-3p, o miR-199a-5p redujo significativamente la capacidad de colonización pulmonar de células A375-LM3 metastásicas (Figura 1E), estableciendo que estos tres miARN son promotores endógenos de la metástasis por células de melanoma humano.

Dados los papeles funcionales robustos de miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p en la promoción de metástasis de melanoma en un modelo en ratón de metástasis de células humanas, se llevaron a cabo ensayos adicionales para examinar si la expresión de estos miARN se correlaciona con la capacidad de las lesiones de melanoma primario humano de metastatizar. Para este fin, se analizaron 71 lesiones cutáneas de melanoma primario obtenidas de pacientes del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) de una forma ciega para determinar los niveles de expresión de miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p mediante qRT-PCR. Consistente con los estudios funcionales anteriores, los tres miARN se indujeron significativamente en melanomas primarios que habían metastatizado respecto a aquellos que no lo habían hecho (Figura 1F; $P = 0,037$ para miR-1908; $P = 0,0025$ para miR-199a-3p; $P = 0,0068$ para miR-199a-5p), lo que sugiere que la expresión regulada al alza de estos miARN en lesiones primarias es un evento temprano predictivo de la progresión del cáncer de melanoma.

Ejemplo 3 *Mir-1908, mir-199a-3p, y mir-199a-5p promueven la invasión celular y el reclutamiento endotelial*

En este Ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para determinar los mecanismos celulares por los que miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p regulan la metástasis.

En primer lugar, se examinó si estos miARN promueven la metástasis mediante el aumento de la proliferación o crecimiento tumoral. Al contrario de esto, la sobreexpresión de cada miARN redujo la proliferación celular (Figura 13A). De forma más importante, la sobreexpresión de miR-1908 no incrementó el crecimiento tumoral primario, mientras la sobreexpresión de miR-199a dio lugar de hecho a una disminución significativa (35%; $P < 0,001$) en el volumen tumoral (Figura 2A), lo que indica que los efectos prometastásicos de miR-1908 y miR-199a no son secundarios a la promoción del crecimiento tumoral o proliferación celular aumentada.

A continuación, se examinó si estos miARN regulan la invasión celular, un fenotipo metastásico clave. Las células LM2 metastásicas, que expresan mayores niveles de estos miARN, presentaron una capacidad de invasión de matrigel significativamente incrementada respecto a su población parental menos metastásica (Figura 13B). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de miR-199a y miR-1908 aumentó individualmente la capacidad de las células MeWo parentales de invadir a través de matrigel (Figura 2B; incremento de tres veces para miR-199; incremento de dos veces para miR-1908). A la inversa, la inhibición individual de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 disminuyó significativamente la capacidad invasiva de los derivados de células metastásicas de melanoma MeWo-LM2 (Figura 2C) así como A375-LM3 (Figura 2D).

Dados los efectos robustos de estos miARN en la progresión metastásica, se llevaron a cabo análisis adicionales para examinar si pueden regular cualquier fenotipo prometastásico adicional. Aunque la sobreexpresión de miR-199a o miR-1908 no moduló la adhesión de células de melanoma a células endoteliales (Figura 13C), resistencia a anoikis (Figuras 13D), supervivencia en el entorno de privación de suero (Figura 13E), o formación de colonias (Figura 13F), cada miARN aumentó dramáticamente (un incremento de más de tres veces) la capacidad de las células MeWo parentales de reclutar células endoteliales en ensayos de reclutamiento endotelial trans-well (Figura 2E). Consistente con esto, las células Mewo-LM2 metastásicas, que sobreexpresan fisiológicamente miR-199a y miR-1908, fueron más eficientes para reclutar células endoteliales respecto a sus células parentales (Figura 13G). A la inversa, la inhibición de miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908 en las células metastásicas MeWo-LM2 (Figura 2F) así como A375-LM3 (Figuras 2G) suprimió el reclutamiento endotelial, lo que es consistente con el requerimiento y suficiencia de estos miARN para una capacidad aumentada de reclutamiento endotelial de células metastásicas de melanoma.

Para determinar si miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 endógenos regulan el reclutamiento endotelial por las células metastásicas *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos para examinar la densidad de los vasos sanguíneos metastásicos realizando una coinmunotinción para vimentina humana, que marca células de melanoma humano MeWo, y el antígeno de células endoteliales de ratón (MECA-32), que marca células endoteliales de ratón. De forma sorprendente, la inhibición de miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908 individualmente dio lugar a disminuciones

pronunciadas (un promedio de 3 veces para miR-199a-3p y miR-199a-5p y 4,7 veces para miR-1908) en la densidad de los vasos sanguíneos en los nódulos metastásicos (Figura 2H; $P < 0,001$ para miR-199a-3p; $P < 0,001$ para miR-199a-5p; y $P < 0,001$ para miR-1908), lo que revela un papel de estos miARN en la promoción del contenido endotelial metastásico y angiogénesis metastásica. A la inversa, la sobreexpresión de cada miARN en células de melanoma poco metastásicas incrementó dramáticamente la densidad de los vasos sanguíneos metastásicos (Figura 13H). Estos descubrimientos revelan que miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 son necesarios y suficientes para una invasión y reclutamiento endotelial aumentados durante la progresión del melanoma.

Ejemplo 4 *Mir-1908, mir-199a-3p, y mir-199a-5p toman como diana de forma convergente y cooperativa a Apoe y DNAJA4*

En este ejemplo, se empleó una estrategia sistemática y no sesgada para identificar las dianas moleculares directas de estos miARN.

Como miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p median los mismos conjuntos de fenotipos *in vitro* e *in vivo* y miR-199a-5p y miR-199a-3p surgen de la misma horquilla precursora, se estableció la hipótesis de que los fenotipos prometastásicos de estos miARN pueden surgir a través del silenciamiento de genes diana comunes. Dado que los miARN de mamíferos actúan predominantemente desestabilizando los transcritos de ARNm diana (Guo *et al.*, 2010 Nature 466, 835- 840), se realizó un perfilado transcriptómico de células de melanoma en el contexto tanto de pérdida como de ganancia de función para cada miARN. Esto reveló un pequeño conjunto de genes que estaban reprimidos tanto por miR-199a como por miR-1908 y que también presentaban niveles menores en los derivados LM2 metastásicos, que expresan niveles endógenos mayores de estos miARN (Figura 14A). La RT-PCR cuantitativa validó dos genes, el gen metabólico de la Apolipoproteína E (ApoE) y la proteína de choque térmico DNAJA4, como modulados significativamente por miR-199a y miR-1908 y silenciados dramáticamente en las células LM2 altamente metastásicas (Figuras 3A y 14B-D).

Para determinar si ApoE y DNAJA4 son dianas directamente de miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p, se examinaron los efectos de cada miARN en la estabilidad de sus posibles dianas a través de ensayos del informador luciferasa heterólogo. De forma interesante, la sobreexpresión de miR-199a reprimió la estabilidad de la región no traducida en 3' (UTR) y la secuencia codificadora (CDS) tanto de ApoE como de DNAJA4, mientras la sobreexpresión de miR-1908 desestabilizó la 3'UTR de ApoE y la 3'UTR y CDS de DNAJA4. Consistente con el direccionamiento directo, la mutación de las secuencias complementarias de miARN en cada diana suprimió la regulación mediada por miARN (Figura 3B). En un ensayo directo de direccionamiento endógeno, la inhibición de miARN individuales en células LM2 metastásicas dio lugar a una estabilidad incrementada de la diana (Figuras 3C) que se suprimió después de mutar los sitios diana de miARN (Figura 14E), lo que revela que ApoE es una diana directa de miR-1908 y miR-199a-5p y que DNAJA4 es una diana directa de los tres miARN (Figura 3D). De forma importante, las CDS y las 3'UTR de estos dos genes fueron menos estables en las células LM2 altamente metastásicas, que expresan niveles fisiológicamente mayores de los tres miARN reguladores, lo que indica que el direccionamiento endógeno hacia ApoE y DNAJA4 de estos miARN es relevante para la metástasis de melanoma (Figura 3E).

Dada la convergencia molecular de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 en genes diana comunes, se examinó a continuación si estas dianas, ApoE y DNAJA4, podrían mediar los fenotipos metastásicos conferidos por estos miARN. La sobreexpresión de cada gen en las células LM2 metastásicas dio lugar a reducciones pronunciadas en los fenotipos de invasión celular y reclutamiento endotelial (Figuras 3F-G, 14F). A la inversa, la inactivación de ApoE o DAJA4 en las células poco metastásicas usando horquillas independentes aumentó significativamente la invasión celular y el reclutamiento endotelial (Figuras 3H-I, 14G), lo que revela que ApoE y DNAJA4 actúan como supresores endógenos de estos fenotipos prometastásicos - consistente con el hecho de ser dianas de los miARN promotores de metástasis mencionados anteriormente.

Ejemplo 5 *ApoE y DNAJA4 median la invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización dependiente de miR-199a y miR-1908*

Para determinar si ApoE y DNAJA4 son los efectores biológicos directos aguas abajo de miR-199a y miR-1908, se llevaron a cabo ensayos para examinar si estos dos genes diana interaccionan epistáticamente con cada miARN. Como se esperaba, el silenciamiento de los miARN redujo la capacidad de invasión y de reclutamiento endotelial de células de melanoma altamente metastásicas. De forma importante, la inactivación de ApoE o DNAJA4 en el entorno de la inhibición de miARN ocluyó significativamente la supresión de la invasión (Figuras 4A y 4C) y el reclutamiento endotelial (Figuras 4B y 4D) después del silenciamiento de cada miARN. De forma sorprendente, la inactivación de cualquiera de estos genes en células deplecionadas para miR-1908 o miR-199a-5p rescató completamente la supresión dramática de la colonización metastásica, que resulta de la inhibición de miARN (Figura 4E-F, 15E). A la inversa, la sobreexpresión de ApoE o DNAJA4 en células que sobreexpresan miR-1908 (Figura 4G-H, 15F) o miR-199a (Figura 15G-I) fue suficiente para suprimir la invasión celular y el reclutamiento endotelial. Adicionalmente, la sobreexpresión de ApoE o DNAJA4 fue suficiente para inhibir la colonización metastásica mediada por miARN (Figura 15J). De forma importante, ApoE y DNAJA4 también se requirieron para la invasión celular y el reclutamiento endotelial aumentados dependientes de miARN por las células A375-LM3 altamente metastásicas (Figuras 4 I-J, 15K).

Para determinar si ApoE y DNAJA4 también regulan el reclutamiento endotelial metastásico dependiente de miARN *in vivo*, se realizó la coinmunotinción de metástasis de melanoma (vimentina humana) y células endoteliales (MECA-32) en nódulos metastásicos pulmonares formados por células con inactivación para cada uno de estos genes en el contexto de la inhibición de miARN. Notablemente, la inactivación de ApoE o DNAJA4 dio lugar a un incremento significativo (>3,5 veces) de la densidad de los vasos sanguíneos metastásicos en metástasis que surgen de células con silenciamiento de miARN (Figura 4K, $P < 0,01$ para células con inactivación tanto de ApoE como de DNAJA4). Estos descubrimientos revelan que ApoE y DNAJA4 son efectores directos aguas abajo de los fenotipos de invasión metastásica, colonización, y reclutamiento endotelial dependientes de miARN inducidos por estos miARN prometastásicos en melanoma.

Ejemplo 6 *La ApoE secretada por células de melanoma es un mediador tanto necesario como suficiente de la invasión y el reclutamiento endotelial, mientras la deleción genética de ApoE promueve la metástasis*

ApoE es un factor secretado. Como tal, se examinó si la ApoE secretada por células de melanoma podría suprimir la invasión y el reclutamiento endotelial. De acuerdo con esto, los niveles de ApoE extracelulares, detectados por ELISA, fueron 3,5 veces menores en células LM2 metastásicas - que expresan niveles mayores de miR-199a y miR-1908 - que en sus células parentales menos metastásicas (Figura 5A). Los niveles de ApoE secretada también se suprimieron significativamente por miR-199a y miR-1908 endógenos (Figuras 5B y 16A).

A continuación, la inhibición de ApoE mediante el uso de un anticuerpo neutralizante (1D7) que reconoce el dominio de unión a receptor de ApoE aumentó tanto la invasión celular (Figura 5C; incremento de 1,68 veces) como el reclutamiento endotelial (Figura 5D; incremento de 1,84 veces) por las células MeWo parentales, que expresan altos niveles endógenos de ApoE (Figura 14C). A la inversa, la adición de ApoE humana recombinante suprimió significativamente la invasión y el reclutamiento endotelial por células LM2 metastásicas (Figura 5E), que presentan bajos niveles de ApoE endógena (Figura 14C). De forma importante, la adición de ApoE recombinante no afectó la proliferación de células de melanoma o células endoteliales *in vitro* (Figura 16B-C) o la supervivencia en condiciones de privación de suero (Figura 16D-E), lo que indica que la supresión de estos fenotipos por ApoE recombinante no es secundaria a una disminución de la proliferación o a una supervivencia alterada. Consistente con que ApoE esté epistáticamente aguas abajo de miR-199a y miR-1908, la neutralización de ApoE con el anticuerpo neutralizante de ApoE 1D7 suprimió significativamente los fenotipos suprimidos de invasión y reclutamiento endotelial observados con la inhibición de cada miARN (Figuras 5F-G). Los descubrimientos anteriores revelan que la ApoE secretada por células de melanoma es un supresor necesario y suficiente de los fenotipos de invasión y reclutamiento endotelial dependientes de miARN en melanoma.

Se llevaron a cabo ensayos adicionales para investigar el mecanismo por el cual DNAJA4, una proteína de choque térmico poco caracterizada, media el reclutamiento endotelial y la invasión. Dadas las características comunes fenotípicas presentadas por ApoE y DNAJA4, se estableció la hipótesis de que DNAJA4 puede jugar un papel regulador y aumentar los niveles de ApoE. De hecho, la inactivación de DNAJA4 redujo tanto los niveles de transcrito de ApoE (Figura 16F) como los niveles de ApoE secretada (Figura 5H), mientas la sobreexpresión de DNAJA4 elevó sustancialmente la expresión de ApoE (Figura 16G). Consistente con que DNAJA4 actúa aguas arriba de ApoE, la adición de ApoE recombinante suprimió los fenotipos aumentados de invasión celular y reclutamiento endotelial observados con la inactivación de DNAJA4 (Figura 5I-J). A la inversa, la supresión de los fenotipos de invasión y reclutamiento endotelial observados con la sobreexpresión de DNAJA4 se ocluyeron significativamente por la neutralización de ApoE con anticuerpo (Figuras 16H-I). Estos descubrimientos revelan que DNAJA4 suprime la invasión y el reclutamiento endotelial del melanoma a través de la regulación positiva de la expresión de ApoE y secreción resultante.

A la vista de la convergencia reguladora de los tres miARN promotores de la metástasis y el gen DNAJA4 en ApoE, se llevaron a cabo ensayos para determinar si la expresión de ApoE se correlaciona con la progresión de melanoma humano. Para este fin, se analizaron datos publicados de expresión basados en matrices para ApoE (Haqq et al, 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *102*, 6092-6097) en lesiones nevi, primarias, y metastásicas. Consistente con un papel supresor de la metástasis, los niveles de ApoE fueron significativamente menores en metástasis en órganos distales respecto a lesiones primarias ($P < 0,025$) y nevi ($P < 0,0003$) (Figura 5K).

Dada su correlación significativa con la progresión del melanoma humano, a continuación se examinó si el incremento de la señalización de ApoE en células de melanoma podría tener una eficacia terapéutica en la supresión de las metástasis de melanoma. Más específicamente, las células MeWo-LM2 metastásicas se preincubaron con ApoE recombinante o BSA durante 24 horas antes de la inyección en ratones. De forma sorprendente, el pretratamiento de las células cancerosas con ApoE suprimió de forma robusta la colonización metastásica más de 300 veces (Figura 5L). Esta supresión dramática de las metástasis por preincubación con ApoE de células de melanoma refleja que los efectos de ApoE sobre las células de melanoma son cruciales para el inicio metastásico, ya que las células pretratadas con ApoE presentan una capacidad invasiva reducida, que es necesaria para iniciar los eventos metastásicos que dan lugar a la colonización pulmonar.

Dada la influencia robusta ejercida por ApoE en la metástasis y los fenotipos metastásicos, así como su fuerte asociación con la progresión del melanoma humano, se llevaron a cabo ensayos adicionales para investigar el impacto

de la deleción genética de ApoE sistémica en la progresión del melanoma en un modelo de ratón inmunocompetente de metástasis de melanoma. Consistente con un papel supresor importante para ApoE extracelular en las metástasis, las células B16F10 de melanoma de ratón inyectadas en la circulación presentaron un incremento mayor de 7 veces en la colonización metastásica en ratones con ApoE genéticamente inactivada ratones comparado con sus compañeros de camada de tipo salvaje (Figura 5M). Estos descubrimientos establecen que ApoE sistémica y secretada por cáncer es un supresor robusto de las metástasis de melanoma humano y de ratón.

Ejemplo 7 *La ApoE extracelular toma como diana de forma divergente los receptores LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales*

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar los mecanismos moleculares por los que ApoE suprime las metástasis.

Con el fin de identificar el o los receptores de ApoE que median la invasión, todos los cuatro receptores conocidos de ApoE, VLDLR, LRP1, LRP8, y LDLR (Hatters et al, 2006 Trends Biochem. Sci. *31*, 445-454; Hauser et al, 2011 Prog. Lipid Res. *50*, 62-74) se inactivaron en células de melanoma. De forma interesante, la inactivación de LRP1, pero no de los demás receptores de ApoE, suprimió el efecto de supresión de la invasión celular inducido por ApoE recombinante (Figura 6A). De forma importante, la inactivación de LRP1 en células LM2 metastásicas, que presentan bajos niveles de ApoE, solo incrementó de forma modesta la invasión celular (Figura 17A), lo que sugiere que los efectos de LRP1 están mediados por la ApoE endógena.

Para determinar si LRP1 también media los efectos dependientes de miARN en la invasión y colonización metastásica, se inactivó LRP1 en el contexto de inhibición de miARN. La inactivación de LRP1 en el entorno de silenciamiento de miARN rescató el fenotipo de invasión suprimido que surge de la inhibición de miARN (Figuras 6B, 17B). Consistente con estos resultados *in vitro*, la inactivación de LRP1 aumentó significativamente la colonización metastásica *in vivo* por células LM2 silenciadas para miR-1908 (Figura 6C, 17C). Estos descubrimientos revelan que LRP1 está epistáticamente aguas abajo de la invasión y colonización metastásica de melanoma dependiente de miARN/ApoE.

Aunque el fenotipo de invasión refleja los efectos autónomos de células de ApoE en células de melanoma, el fenotipo de reclutamiento endotelial sugiere un papel no autónomo de células de la ApoE expresada por cáncer directamente en las células endoteliales. Consistente con esto, el pretratamiento de células endoteliales con ApoE redujo significativamente su capacidad de migrar hacia células cancerosas altamente metastásicas (Figura 6D). Con el fin de identificar el o los receptores de ApoE en las células endoteliales que median el fenotipo de reclutamiento endotelial, los cuatro receptores de ApoE conocidos se inactivaron en células endoteliales. De forma interesante, a diferencia de la invasión de células cancerosas, la inactivación de LRP8 endotelial, pero no de cualquiera de los demás receptores, suprimió selectivamente y significativamente la inhibición del reclutamiento endotelial causada por el silenciamiento de miARN (Figuras 6E, 17D-E). Estos descubrimientos son consistentes con que el receptor LRP8 sea el mediador endotelial aguas abajo de los efectos en el reclutamiento endotelial dependientes de miARN/ApoE.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos para examinar si la señalización de ApoE/LRP8 también podría regular la migración endotelial general en un sistema sin células cancerosas. De acuerdo con esto, la neutralización con anticuerpo de ApoE, que está presente en el medio de las células endoteliales, aumentó significativamente la migración endotelial (Figura 6F), mientras la ApoE recombinante fue suficiente para inhibir la migración endotelial en un ensayo trans-well (Figura 6G) y en un ensayo quimiotáctico basado en gradiente (Figura 6H) de una manera dependiente del receptor LRP8 de células endoteliales. De forma importante, la adición de ApoE dio lugar a una supresión dramática (mayor de 40 veces) del reclutamiento endotelial inducido por VEGF *in vivo* en tapones de matrigel subcutáneos (Figura 6I).

Dado el requerimiento y suficiencia de ApoE para mediar el reclutamiento endotelial, se llevaron a cabo ensayos adicionales para examinar si la ApoE sistémica podría regular la angiogénesis metastásica. Consistente con la supresión robusta del contenido endotelial metastásico por ApoE secretada por células de melanoma (Figura 4K), los ratones con inactivación genética de ApoE presentaron mayores densidades de vasos sanguíneos en sus nódulos metastásicos pulmonares formados por células B16F10 de melanoma de ratón comparado con sus compañeros de camada de tipo salvaje (Figura 6J; incremento de 2,41 veces, P = 0,0055). Tomados conjuntamente, los descubrimientos anteriores revelan papeles duales autónomos de células/no autónomos de células para ApoE en la supresión de la metástasis a través de una señalización divergente mediada por los receptores LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales.

Ejemplo 8 *MiR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 como dianas robustas de pronóstico y terapéuticas en metástasis de melanoma*

Para examinar si los miARN promotores de la metástasis descritos en la presente memoria podían servir como predictores clínicos de resultados metastásicos, se cuantificaron los niveles de expresión de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 de una forma ciega por qRT-PCR en una cohorte de muestras de melanoma humano obtenidas de pacientes en MSKCC. Se determinó entonces la relación entre los niveles de estos miARN en lesiones de melanoma primarias y los resultados de recidiva metastásica.

De forma importante, los pacientes cuyas lesiones de melanoma primarias expresaban mayores (mayores que la mediana para la población) niveles de miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908 eran más propensos a desarrollar metástasis distales y presentaron tiempos de supervivencia sin metástasis significativamente más cortos que los pacientes cuyos melanoma primarios expresaban niveles menores de estos miARN (Figuras 7A-C, *P* = 0,0032 para miR-199a-3p, *P* = 0,0034 para miR-199a- 5p, y *P* = 0,027 para miR-1908). De forma sorprendente, los niveles de expresión agregados de los tres miARN presentaron la capacidad de pronóstico más fuerte en la estratificación de pacientes en alto riesgo de aquellos con muy bajo riesgo para recidiva metastásica (Figura 7D, *P* < 0,0001). Estos descubrimientos clínicos son consistentes con la cooperatividad funcional entre estos miARN en la regulación de la progresión del cáncer y sugieren la utilidad de estas moléculas como biomarcadores del pronóstico clínico de las metástasis de melanoma.

A la vista de la ausencia actual de opciones de tratamiento efectivas para la prevención de las metástasis de melanoma y el fuerte valor de pronóstico de los tres miARN reguladores en las metástasis de melanoma, estos miARN se tomaron como diana terapéuticamente usando terapia de LNA antisentido (Elmer et al, 2008(a); Elmer et al, 2008(b)). Las células MeWo-LM2 altamente metastásicas pretratadas con oligonucleótidos LNA antisentido frente a miR-199a-3p, miR-199a-5p, o miR-1908 maduros presentaron aproximadamente una disminución de cuatro veces en la actividad metastásica. Dada la evidencia clínica de cooperatividad entre estos miARN, se examinó el impacto del silenciamiento de los tres miARN en la progresión metastásica. De forma importante, la cotransfección de LNA frente a los tres miARN suprimió la colonización metastásica más de setenta veces, lo que revela la sinergia y cooperatividad dramática entre los miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 endógenos (Figura 7E, *P* = 0,004). De forma importante, la inhibición de estos miARN con un pretratamiento con triple LNA no dio lugar a una disminución de la proliferación *in vitro* (Figura 18 A), lo que indica que el fenotipo de supresión dramática de la metástasis no es secundario a una proliferación alterada. El direccionamiento combinatorio de miARN mediado por LNA en la línea derivada metastásica de A375 independiente también inhibió significativamente la colonización pulmonar (Figura 18B).

A continuación, se examinó si la inhibición combinatoria de miARN inducida por LNA podía suprimir la metástasis de melanoma sistémica a múltiples órganos distantes. De hecho, la inyección intracardiaca de células de melanoma altamente metastásicas pretratadas con una mezcla de LNA dirigidos a los tres miARN reguladores reveló que los miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 endógenos promueven la metástasis de melanoma sistémico (Figura 7F). La inhibición mediada por LNA combinatoria de los tres miARN dio lugar a una reducción en el número de focos metastásicos sistémicos (Figura 7G) en sitios distales tales como el cerebro y los huesos (Figuras 7H-I).

Se llevaron a cabo ensayos adicionales para examinar la eficacia terapéutica de LNA optimizados *in vivo* administrados sistémicamente en la prevención de la metástasis del melanoma. Para este fin, se inyectaron células MeWo-LM2 altamente metastásicas en ratones. Al día siguiente, los ratones se trataron por vía intravenosa con LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 a una dosis baja total de (12,5 mg/kg) en una base bisemanal durante cuatro semanas. Notablemente, un tratamiento con LNA combinatorio redujo la colonización pulmonar 9 veces (Figura 7J, *P* = 0,031) sin ningún signo aparente de toxicidad (Figura 18C). Tomados conjuntamente, los descubrimientos anteriores revelan una nueva red reguladora dependiente de miARN que converge en la señalización de ApoE para controlar las características autónomas de células y no autónomas de células de la progresión metastásica del melanoma (Figura 7K). Los estudios básicos anteriores han identificado un conjunto de miARN con un potencial poderoso de pronóstico y terapéutico en la gestión clínica del melanoma.

Ejemplo 9 *La toma como diana dependiente de miARN de la señalización de ApoE/LRP1 promueve la invasión de células cancerosas y el reclutamiento endotelial a través de la inducción de CTGF*

En este ejemplo, se identificó al Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (CTGF) como un mediador aguas abajo de la señalización de ApoE/LRP1 en la invasión de células cancerosas y el reclutamiento endotelial. El nivel de expresión de CTGF, como se determina por análisis de qRT-PCR y ELISA, está mediado por la señalización de ApoE/LRP1 (Figura 8A, 8B, y 8C). Adicionalmente, la invasión de células cancerosas y el reclutamiento endotelial regulados por ApoE/LRP1 están mediados por CTGF (Figura 8D, 8E).

Ejemplo 10 *CTGF media la invasión metastásica, el reclutamiento endotelial, y la colonización dependientes de miARN*

En este Ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar si CTGF media la invasión y el reclutamiento endotelial dependientes de miARN. Brevemente, se realizaron ensayos de invasión celular trans-well y reclutamiento endotelial en células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a o miR-1908 en presencia de un anticuerpo bloqueante dirigido a CTGF. De hecho, se encontró que la invasión metastásica y el reclutamiento endotelial dependientes de mir-199a y mir-1908 están mediados por CTGF (Figura 9A y 9B). Con el fin de investigar si la metástasis de melanoma *in vivo* (colonización metastásica) está mediada por CTGF, se realizó análisis de imagen bioluminiscente en metástasis pulmonares por 5 x 10^4 células MeWo parentales con inactivación de CTGF en el entorno de la sobreexpresión de miR-199a o miR-1908. La inactivación de CTGF en este entorno dio lugar a una reducción significativa de las metástasis de melanoma *in vivo* (Figura 9C).

Ejemplo 11 *El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 eleva los niveles de ApoE y DNAJA4 en células de melanoma y suprime la invasión de células cancerosas, el reclutamiento endotelial, y la colonización metastásica*

Se ha mostrado previamente que agonistas del Receptor X Hepático (LXR) que son moléculas pequeñas incrementan los niveles de ApoE. Para investigar si el incremento de los niveles de Apo-E a través de la activación de LXR daba lugar a un beneficio terapéutico, se llevaron a cabo ensayos para evaluar el efecto del agonista de LXR GW3965 [nombre químico: hidrocloruro del ácido 3-[3-[N-(2-Cloro-3-trifluorometilbencil)-(2,2-difeniletil)amino]propiloxi] fenilacético) sobre los niveles de Apo-E, invasión de células tumorales, reclutamiento endotelial, y metástasis de melanoma *in vivo* (Figura 10). La incubación de células MeWo parentales en presencia de concentraciones terapéuticas de GW3965 incrementó la expresión de ApoE y DNAJA4 (Figura 10A y 10B). El pretratamiento de células MeWO con GW3965 disminuyó la invasión de células tumorales (Figura 10C) y el reclutamiento endotelial (Figura 10D). Para ensayar si GW3965 podía inhibir la metástasis *in vivo*, se administró a los ratones una dieta de pienso basado en grano que contenía GW3965 (20mg/kg) o una dieta control, y se ensayaron las metástasis pulmonares usando bioluminiscencia después de la inyección a través de la vena de la cola de 4 x 10^4 células MeWo parentales en los ratones (Figura 10E). La administración oral de GW3965 a los ratones de esta manera dio lugar a una reducción significativa de las metástasis de melanoma *in vivo* (Figura 10E).

Ejemplo 12 *Identificación de mir-7 como un supresor endógeno de metástasis de melanoma*

En este ejemplo, se identificó a miR-7 como un supresor endógeno de metástasis de melanoma (Figura 11). Para ensayar si miR-7 suprime las metástasis de melanoma *in vivo*, se inactivó su expresión en células MeWo parentales usando la tecnología miR-Zip (Figura 11A). La representación de análisis de imagen bioluminiscente de la colonización metastásica pulmonar después de la inyección intravenosa de 4 x 10^4 células MeWo parentales que expresaban un inhibidor de horquilla corta (miR-Zip) de miR-7 (miR-7 KD) incrementó significativamente las metástasis pulmonares *in vivo* (Figura 11A). A la inversa, la sobreexpresión de miR-7 en células LM2 redujo significativamente las metástasis pulmonares *in vivo* (Figura 11B).

La complejidad del cáncer requiere la aplicación de análisis sistemáticos (Pe'er y Hacohen, 2011). A través de una estrategia sistemática global, se descubrió una red cooperativa de miARN. Los miARN i) están regulados al alza en células de melanoma humano altamente metastásicas, ii) se requieren y son suficientes para la colonización y angiogénesis metastásicas en melanoma, y iii) son predictores patológicos robustos de la recidiva metastásica de melanoma humano. A través de una estrategia de identificación de dianas con base transcriptómica y guiada biológicamente, se encontró que miR-1908, miR-199a-3p, y miR-199a-5p tenían como diana de manera convergente el factor de choque térmico DNAJA4 y el gen metabólico ApoE. El requerimiento de cada miARN individual para la metástasis indica que estos tres miARN convergentes no son redundantes en la promoción de las metástasis de melanoma, mientras la supresión de metástasis robusta sinérgica conseguida por la inhibición de miARN combinatoria revela una cooperatividad funcional entre estos miARN, conseguida presumiblemente a través del silenciamiento máximo de ApoE y DNAJA4. La identificación de ApoE como un gen regulado negativamente por tres miARN promotores de metástasis, regulados positivamente por un gen supresor de metástasis (DNAJA4), y silenciado en muestras clínicas de metástasis resalta la significancia de este gen como un supresor de la progresión del melanoma.

Ejemplo 13 *Identificación de la señalización de LXRβ como una nueva diana terapéutica en melanoma*

Para identificar los receptores de hormonas nucleares que muestran una amplia expresión en melanoma, examinamos los niveles de expresión de todos los miembros de la familia de receptores de hormonas nucleares en la colección NCI-60 de líneas celulares de melanoma humano. Varios receptores presentaron una expresión estable en las múltiples líneas de melanoma, lo que sugiere que podían representar nuevas dianas potenciales en melanoma (Figuras 19A y 20A). Notablemente, de estos, se ha mostrado previamente que los receptores X hepáticos (LXR) aumentan la transcripción de *ApoE* en adipocitos y macrófagos (Laffitte *et al.*, 2001), mientras que se encontró que la activación farmacológica de los RXR dirigía la expresión de *ApoE* en modelos de Alzheimer preclínicos (Cramer *et al.*, 2012).

Dado el papel supresor de metástasis recientemente descubierto de ApoE en melanoma (Pencheva *et al.*, 2012), la expresión basal ubicua de LXRβ y RXRα en melanoma, y la disponibilidad de agentes farmacológicos para activar terapéuticamente los LXR y RXR, investigamos si la activación de los LXR o RXR en células de melanoma podría inhibir los fenotipos de progresión del melanoma. A la luz de los papeles establecidos de los receptores de hormonas nucleares tales como ER y AR en la regulación de la proliferación celular en el cáncer de mama y de próstata, examinamos en primer lugar si el agonismo farmacológico de los LXR o RXR en células de melanoma afecta el crecimiento celular *in vitro*.

El tratamiento de células de melanoma con dos agonistas de LXR estructuralmente distintos, GW3965 **2** o T0901317 **1**, o el agonista de RXR bexaroteno no afectó las tasas de proliferación celular o viabilidad celular (Figura 20 B-C). A continuación, evaluamos los efectos de la activación de LXR o RXR en la invasión celular y el reclutamiento endotelial - fenotipos presentados por poblaciones de melanoma metastásico y cáncer de mama metastásico (Pencheva *et al.*, 2012; Png *et al.*, 2012). El tratamiento de las líneas de melanoma humano mutacionalmente diversas MeWo (*B-Raf/N-Ras* tipo salvaje), HT-144 (*B-Raf* mutante), y SK-Mel-2 (*N-Ras* mutante), así como la línea de melanoma humano

primario SK-Mel-334.2 (*B-Raf* mutante) con GW3965 **2** o T0901317 **1** suprimió de forma consistente la capacidad de las células de melanoma de invadir a través de matrigel y de reclutar células endoteliales en ensayos trans-well (Figura 19B-C). En comparación, el tratamiento con bexaroteno suprimió la invasión en solo la mitad de las líneas de melanoma ensayadas y no afectó significativamente el fenotipo de reclutamiento endotelial (Figuras 19B-C).

Dada la superioridad del agonismo de LXR sobre RXR en la inhibición amplia tanto de la invasión celular como del reclutamiento endotelial en múltiples líneas de melanoma, investigamos el requerimiento de la señalización de LXR en la mediación de los efectos supresores de los agonistas de LXR. La inactivación de *LXRβ* de melanoma, pero no de *LXRα*, suprimió la capacidad de GW3965 **2** y T0901317 **1** de suprimir la invasión y el reclutamiento endotelial (Figura 19D-G y Figuras 20D-G), lo que revela que el LXRβ de células de melanoma es la diana funcional de los agonistas de LXR en la incitación de la supresión de estos fenotipos *in vitro*. Nuestros descubrimientos moleculares son consistentes con que *LXRβ* sea la isoforma de LXR predominante expresada por células de melanoma (Figura 19A, $P < 0{,}0001$).

La expresión basal ubicua de *LXRβ* en melanoma es probablemente un reflejo del papel general que juegan los LXR en el control del transporte, síntesis, y catabolismo de lípidos (Calkin y Tontonoz, 2013). Aunque dicha expresión estable de *LXRβ* sería clave para mantener el metabolismo y crecimiento de las células de melanoma, también hace que la señalización de LXR sea un candidato atractivo para el direccionamiento terapéutico de amplio espectro en melanoma.

Ejemplo 14 *La Administración terapéutica de agonistas de LXR suprime el crecimiento tumoral del melanoma*

Los agonistas de LXR se desarrollaron originalmente como candidatos de fármacos orales para el propósito de disminuir el colesterol en pacientes con dislipidemia y aterosclerosis (Collins *et al.*, 2002; Joseph y Tontonoz, 2003). Estos compuestos se abandonaron clínicamente por su incapacidad de reducir los niveles de lípidos en modelos preclínicos en animales grandes (Groot *et al.*, 2005).

Dada la capacidad robusta de GW3965 **2** y T0901317 **1** de suprimir los fenotipos de progresión del melanoma *in vitro* (Figura 19B-C), investigamos si la activación terapéutica de LXR podría utilizarse para el tratamiento del melanoma. De hecho, la administración oral de GW3965 **2** o T0901317 **1** a dosis bajas (20 mg/kg), posteriormente a la formación de tumores subcutáneos con un volumen de 5-10 mm^3, suprimió el crecimiento tumoral por las células agresivas de melanoma de ratón B16F10 en un modelo inmunocompetente un 67% y 61%, respectivamente (Figura 21A-B). La administración de una dosis mayor de agonista de LXR (100 mg/kg) dio lugar a una reducción de 80% en el crecimiento tumoral (Figura 21A), consistente con efectos supresores dependientes de la dosis.

La administración oral de GW3965 **2** también suprimió de forma robusta el crecimiento tumoral por las líneas celulares de melanoma humano MeWo (inhibición del 70%) y SK-Mel-2 (inhibición del 49%), así como la línea de melanoma primario humano SK-Mel-334.2 (inhibición del 73%) (Figura 21C-E y Figura 22A).

Animados por el impacto robusto supresor de tumores de los agonistas de LXR en tumores pequeños (5-10 mm^3) (Figura 21A-E), investigamos a continuación si la terapia de activación de LXR podía inhibir el crecimiento de tumores grandes (~150 mm^3).

Encontramos que el tratamiento con GW3965 **2** dio lugar a una reducción de aproximadamente el 50% en el crecimiento de tumores B16F10 grandes establecidos (Figura 21F). De forma importante, la administración terapéutica de GW3965 **2** posteriormente al establecimiento de los tumores prolongó sustancialmente el tiempo de supervivencia global de ratones inmunocompetentes a los que se inyectaron células B16F10, ratones inmunocomprometidos que portaban xenoinjertos tumorales derivados de la línea de melanoma humano establecido MeWo, así como la línea de melanoma humano primario SK-Mel.334-2 (Figura 21G-I). Estos descubrimientos son consistentes con una capacidad de respuesta de amplio espectro a la terapia de activación de LXR en tumores de melanoma establecidos melanóticos y amelanóticos de diversos subtipos mutacionales: *B-Raf* y *N-Ras* de tipo salvaje (B16F10 y MeWo; Figura 21A-C), *B-Raf* mutante (SK-Mel-334.2; Figura 21D), y *N-Ras* mutante (SK-Mel-2; Figura 21E).

A continuación, buscamos determinar los fenotipos biológicos celulares regulados por los agonistas de LXR en la supresión del crecimiento tumoral. Consistente con los efectos inhibidores de GW3965 **2** en el reclutamiento endotelial por células de melanoma *in vitro*, la administración de GW3965 **2** dio lugar a una reducción de aproximadamente 2 veces en el contenido de células endoteliales de los tumores (Figura 21J). Este efecto estuvo acompañado de una disminución modesta (23%) en el número de células tumorales con proliferación activa *in vivo* (Figura 21K) sin un cambio en el número de células apoptóticas (Figura 21L). Estos resultados sugieren que, además de reducir la invasión tumoral local, la activación de LXR suprime el crecimiento tumoral del melanoma principalmente a través de la inhibición de la angiogénesis tumoral con una reducción resultante en la proliferación *in vivo*.

Ejemplo 15 *El agonismo de LXR suprime las metástasis de melanoma al pulmón y cerebro e inhibe la progresión de metástasis incipientes*

Los fuertes efectos supresores de los agonistas de LXR en el crecimiento tumoral de melanoma nos motivaron a examinar si la activación de LXR podía suprimir también la colonización metastásica por células de melanoma. Para este fin, el pretratamiento de células de melanoma humano MeWo con GW3965 **2** dio lugar a una reducción de más de 50 veces en su capacidad de colonización metastásica (Figura 23A). A la luz de este efecto inhibidor dramático, evaluamos a continuación la capacidad de agonistas de LXR administrados oralmente de suprimir las metástasis. Los ratones inmunocomprometidos a los que se había administrado oralmente GW3965 **2** o T0901317 **1** experimentaron reducciones respectivas de 31 veces y 23 veces en la colonización metastásica pulmonar por células humanas MeWo (Figura 23B-C). El tratamiento con GW3965 **2** también suprimió la colonización metastásica por la línea de melanoma HT-144 (Figura 23D) así como la línea de melanoma primario SK-Mel-334.2 (Figura 23E).

GW3965 **2** es una molécula lipofílica que puede cruzar de manera eficiente la barrera hematoencefálica y activar potentemente la señalización de LXR en el cerebro. Consistente con esto, se ha mostrado previamente que la administración oral de GW3965 **2** mejora la patología de las placas amiloides y los déficits de memoria en modelos preclínicos de la enfermedad de Alzheimer (Jiang et al, 2008). Nos preguntamos así si el agonismo de LXR podría presentar una actividad terapéutica en la supresión de las metástasis cerebrales del melanoma - un resultado temido del melanoma con una necesidad urgente de terapias efectivas (Fonkem *et al.*, 2012). Notablemente, la administración oral de GW3965 **2** inhibió tanto la diseminación sistémica como la colonización cerebral después de la inyección intracardiaca de células de melanoma metastásicas en el cerebro derivadas de la línea parental MeWo (Figura 23F). Estos resultados revelan una supresión robusta de la metástasis por la terapia de activación de LXR en múltiples líneas de melanoma y en múltiples sitios metastásicos en órganos distales.

Animados por los efectos robustos observados en la supresión de la formación de metástasis (Figura 23A-F), a continuación buscamos determinar si la terapia de activación de LXR podría parar la progresión de las células de melanoma que ya se han diseminado metastásicamente. En primer lugar, ensayamos la capacidad de GW3965 **2** de reducir la colonización pulmonar por células de melanoma que se diseminan desde un sitio ortotópico después de la eliminación del tumor primario (Figura 23G). De forma importante, la administración oral de GW3965 **2** después de la escisión tumoral inhibió la colonización pulmonar por células de melanoma diseminadas 17 veces (Figura 23H). De forma importante, el tratamiento de ratones con GW3965 **2** también suprimió dramáticamente (28 veces) la colonización por metástasis pulmonares incipientes que habían progresado 8 veces desde la línea base a la siembra (Figura 23I). Consistente con que la activación de LXR inhibe el inicio metastásico, el tratamiento con GW3965 **2** disminuyó el número de nódulos metastásicos macroscópicos formados (Figura 23J). Finalmente, el tratamiento de ratones con GW3965 **2** en este contexto preclínico 'adyuvante' prolongó significativamente sus tiempos de supervivencia después de la colonización metastásica (Figura 23K).

Ejemplo 16 *La activación de LXR reduce la progresión y metástasis del melanoma en un modelo de melanoma dirigido genéticamente en ratón*

Aproximadamente el 60% de los tumores de melanoma humano están marcados por mutaciones activadoras en el oncogén *Braf*, siendo una variante de un único aminoácido, *B-Raf*^{V600E}, la mutación predominante encontrada (Davies *et al.*, 2002). Cerca del 20% de los melanomas presentan mutaciones activadoras en *B-Raf* con el silenciamiento concurrente del supresor tumoral *Pten*, que dirige la progresión a un estado de melanoma maligno (Tsao *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 2006). Recientemente, se ha mostrado que la activación de *B-Raf* y pérdida de *Pten* condicional dirigidas por *tirosinasa (Tyr)* cooperan genéticamente para dirigir la progresión del melanoma en ratones (Dankort *et al.*, 2009).

Para determinar si la activación de LXR podría suprimir la progresión del melanoma en este modelo iniciado genéticamente, inducimos melanomas en ratones *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/+}$ y *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/lox}$ por la administración intraperitoneal de 4-hidroxitamoxifeno (4-HT). Notablemente, la administración oral de GW3965 **2** después del inicio del melanoma atenuó la progresión tumoral y prolongó significativamente los tiempos de supervivencia global de ratones tanto heterocigotos para *PTEN Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/+}$ como homocigotos para *PTEN Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/lox}$ (Figura 24A-B y Figura 25A-B). A continuación, examinamos la capacidad de GW3965 **2** de suprimir la metástasis de melanoma en este contexto genético. Aunque no detectamos metástasis macroscópicas en los pulmones o cerebros de los ratones control *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/lox}$ tratados con 4-HT, observamos de forma consistente metástasis de melanoma en los nódulos linfáticos de las glándulas salivares. De forma importante, los ratones *Tyr::CreER; B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{lox/lox}$ tratados con GW3965 **2** presentaron una disminución en el número de metástasis linfáticas detectadas *post-mortem* (Figura 24C). Estos descubrimientos indican que la activación de LXR inhibe la metástasis ortotópica en un modelo de melanoma dirigido genéticamente, además de sus efectos supresores en la progresión de tumor de melanoma primario.

La cooperatividad entre la activación de *B-Raf* y la pérdida de *Pten* en la dirección de la progresión del melanoma puede aumentarse más por la inactivación de *CDKN2A*, un regulador del ciclo celular mutado frecuentemente en melanomas familiares (Hussussian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994). Examinamos así el efecto de la activación de LXR en los melanomas *B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{-/-}$*; CDKN2A*$^{-/-}$, lo que nos permitió ensayar la eficacia terapéutica del agonismo de LXR en un modelo de progresión de melanoma dirigido genéticamente más agresivo. De forma importante, la administración terapéutica de GW3965 **2** inhibió de forma robusta el crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar por células de melanoma primario de ratón *B-Raf*$^{V600E/+}$*; Pten*$^{-/-}$*; CDKN2A*$^{-/-}$, inyectadas en ratones singénicos inmunocompetentes y prolongó la supervivencia global de ratones que portaban la carga de melanoma *B-Raf*$^{V600E/+}$*;*

Pten$^{-/-}$; *CDKN2A*$^{-/-}$ (Figura 24D-F). Tomados conjuntamente, la supresión robusta de la progresión del melanoma en modelos de melanoma en ratones inmunocompetentes independientes de xenoinjertos e inducidos genéticamente que presentan los diversos perfiles mutaciones de los melanomas humanos motiva el ensayo clínico de la terapia de activación de LXR.

Ejemplo 17 *La activación farmacológica de LXRβ suprime los fenotipos de melanoma por la inducción transcripcional de la expresión de ApoE por células de melanoma*

A continuación, buscamos determinar la diana molecular aguas abajo de LXRβ que media la supresión de la progresión del melanoma. Para este fin, perfilamos transcriptómicamente células de melanoma MeWo humanas tratadas con el agonista de LXR GW3965 **2**.

De los 365 genes que se indujeron significativamente en respuesta a la activación de LXR, identificamos *ApoE*, una diana transcripcional de los LXR validada previamente en macrófagos y adipocitos (Laffitte *et al.*, 2001), como el factor secretado más regulado al alza en células de melanoma (Figura 26). La validación por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) reveló una regulación al alza robusta de la expresión del transcrito de *ApoE* después del tratamiento con agonistas de LXR independientes en múltiples líneas de melanoma humano (Figura 27A-C).

A la vista de la función supresora de metástasis de ApoE reportada previamente en melanoma (Pencheva *et al.*, 2012), investigamos si la activación de LXRβ suprime la progresión del melanoma a través de la inducción transcripcional de *ApoE*. De hecho, se encontró que GW3965 **2** y T0901317 **1** aumentan la actividad dirigida por las células de melanoma de una construcción de informador de luciferasa que contiene el promotor de *ApoE* fusionado con cualquiera de dos elementos multipotenciadores de unión a LXR caracterizados previamente (ME.1 o ME.2) (Laffitte *et al.*, 2001) (Figura 28A). De forma importante, esta inducción transcripcional dio lugar a niveles elevados de proteína ApoE secretada (Figura 28B). Consistente con el direccionamiento directo de LXRβ a *ApoE* en células de melanoma, la neutralización de ApoE extracelular con un anticuerpo bloqueó completamente la supresión mediada por LXRβ de la invasión celular y el reclutamiento endotelial y aumentó adicionalmente estos fenotipos respecto al tratamiento con IgG control (Figura 28C-G y Figura 27D-F), lo que revela que los efectos del agonismo de LXR están modulados por la ApoE extracelular.

Adicionalmente, la inactivación molecular de *ApoE* en células de melanoma también bloqueó la supresión mediada por GW3965 **2** de los fenotipos de invasión celular y reclutamiento endotelial (Figura 27G-H). De acuerdo con esto, la depleción de células de melanoma de *LXRβ*, pero no de *LXRα*, suprimió la capacidad de GW3965 **2** y T0901317 **1** de regular al alza la transcripción de *ApoE* y finalmente la expresión de la proteína (Figura 28H-I y Figura 27I-K). Colectivamente, estos descubrimientos indican que la activación farmacológica de LXRβ, la isoforma predominante de LXR expresada por células de melanoma, suprime la invasión celular intrínseca y el reclutamiento endotelial por células de melanoma a través de la activación transcripcional de la expresión de *ApoE* en células de melanoma.

Ejemplo 18 *Implicación de ApoE derivada de melanoma y sistémica por la terapia de activación de LXRβ*

La supresión inducida por LXRβ de los fenotipos clave del melanoma por ApoE extracelular *in vitro* sugirió que los efectos supresores de los agonistas de LXR *in vivo* podrían aumentar más por la activación de los LXR en los tejidos periféricos, que podrían servir como fuentes robustas de ApoE extracelular.

De forma importante, dichos tejidos no transformados serían menos vulnerables a desarrollar resistencia a la terapia de activación de LXR, permitiendo la inducción crónica de *ApoE* en pacientes. Investigamos así si el agonismo de LXR terapéutico suprime la progresión de melanoma mediante la inducción de *ApoE* derivada de células de melanoma o tejidos sistémicos. Consistente con que el agonismo de LXRβ incrementa la expresión de *ApoE* en células de melanoma *in vivo*, los niveles del transcrito de *ApoE* se regularon al alza en tumores primarios de melanoma, así como en metástasis de melanoma en pulmón y cerebro disociados de ratones que se alimentaron con una dieta suplementada con agonista de LXR (Figura 29A-E). De forma importante, el tratamiento de ratones bien con GW3965 **2** o T0901317 **1** elevó significativamente la expresión de la proteína ApoE en tejidos sistémicos adiposo, de pulmón y cerebro de los ratones (Figuras 30A-B) y también reguló al alza los niveles de transcrito de *ApoE* en células sanguíneas blancas circulantes (Figura 30C). Estos resultados indican que la terapia de activación de LXR induce tanto la expresión de *ApoE* en células de melanoma como en tejidos sistémicos *in vivo*.

Para determinar el requerimiento *in vivo* de la activación de LXR derivada de melanoma y sistémica para los efectos supresores de tumores de los agonistas de LXR administrados oralmente, ensayamos en primer lugar la capacidad de GW3965 **2** de suprimir el crecimiento tumoral por células de melanoma ratón B16F10 deplecionadas de LXRβ.

Consistente con nuestros descubrimientos en células de melanoma humano, la inactivación de *LXRβ* de células de melanoma de ratón suprimió la inducción de la expresión de *ApoE* mediada por GW3965 (Figura 29F-H). A pesar de esto, la inactivación de *LXRβ* de células de melanoma fue incapaz de prevenir la supresión del crecimiento tumoral por GW3965 **2** (Figura 29D), lo que implica un papel para la activación de LXR sistémica en la inhibición del crecimiento tumoral por GW3965 **2**. Para identificar la isoforma de LXR que media esta supresión no autónoma de tumor del crecimiento del melanoma por agonistas de LXR, examinamos los efectos de GW3965 **2** en tumores implantados en ratones con inactivación genética de *LXRα* o *LXRβ*. De forma interesante, la ablación genética de *LXRβ* sistémica

bloqueó la capacidad de GW3965 de suprimir el crecimiento tumoral del melanoma, mientras la inactivación de *LXRα* no tuvo efecto en la inhibición del crecimiento tumoral por GW3965 (Figura 6D). De forma importante, la regulación al alza de la expresión de *ApoE* sistémica por GW3965 **2**, un agonista con una actividad 6 veces mayor para LXRβ que para LXRα, se suprimió en ratones *LXRβ -/-*, pero no en ratones *LXRα -/-* (Figura 30E y Figura 29I). Estos resultados indican que la inducción de *ApoE* por GW3965 **2** en tejidos periféricos está dirigida predominantemente por la activación de LXRβ sistémica. De acuerdo con esto, encontramos que LXRβ sistémica era la diana molecular principal y efector de GW3965 **2** en la mediación de la supresión del crecimiento tumoral del melanoma.

A continuación, examinamos si ApoE se requiere para los efectos supresores de melanoma *in vivo* de los agonistas de LXR. Consistente con la ausencia de un impacto de la inactivación de *LXRβ* de células de melanoma en la actividad supresora de tumores de GW3965 **2**, la depleción de *ApoE* de células de melanoma tampoco previno la inhibición del crecimiento tumoral por GW3965 **2** (Figura 29F-H y Figura 30F). Estos descubrimientos sugieren que los efectos supresores de tumores de GW3965 **2** podrían estar mediados principalmente a través de la inducción de *ApoE* en tejidos sistémicos.

De hecho, GW3965 **2** fue completamente inefectivo en la supresión del crecimiento tumoral en ratones con inactivación genética de *ApoE* (Figura 30F), lo que revela que la *ApoE* sistémica es el efector aguas abajo de LXRβ sistémico para dirigir la supresión del crecimiento tumoral del melanoma. De forma interesante, a diferencia de la regulación del crecimiento tumoral primario, la inactivación de la *ApoE* de células de melanoma previno parcialmente el efecto supresor de metástasis de GW3965 **2** (Figura 30G). De forma similar, también la inactivación genética de *ApoE* solo previno parcialmente la supresión de metástasis incitada por GW3965 **2** (Figura 30G). La inhibición de metástasis dirigida por GW3965 se bloqueó completamente solo en el contexto tanto de la inactivación de *ApoE* de células de melanoma como la inactivación genética de *ApoE* sistémica (Figura 30G), indicativo de un requerimiento de la implicación tanto de *ApoE* derivada de células de melanoma como sistémica por LXRβ en la supresión de metástasis. Concluimos así que los efectos de la activación de LXRβ en el crecimiento tumoral primario están incitados principalmente a través de la inducción de *ApoE* sistémica, mientras los efectos del agonismo de LXRβ en la metástasis están mediados a través de la inducción transcripcional de *ApoE* tanto en células de melanoma como en tejidos sistémicos.

La identificación de ApoE como el único mediador aguas abajo de la supresión de fenotipos de melanoma inducida por LXRβ relata más la importancia de este gen como un supresor de la progresión del melanoma. Para determinar si la expresión de ApoE es un pronóstico clínico de los resultados metastásicos del melanoma, evaluamos los niveles de la proteína ApoE mediante la realización de análisis de inmunohistoquímica ciegos en 71 lesiones de melanoma primario humano extraídas quirúrgicamente.

Encontramos que los pacientes cuyos melanomas habían metastatizado presentaban una expresión de ApoE aproximadamente 3 veces menor en sus tumores primarios respecto a los pacientes cuyos melanomas no habían metastatizado (Figura 30H, P = 0,002). De forma importante, los niveles de expresión de ApoE en las lesiones de melanoma primario de los pacientes estratificó de forma robusta a los pacientes en alto riesgo respecto a los que presentaban bajo riesgo de recidiva metastásica (Figura 30I, P = 0,002). Estas observaciones son consistentes con descubrimientos previos que revelaron niveles significativamente menores de ApoE en metástasis de melanoma distantes respecto a las lesiones primarias (Pencheva *et al.*, 2012). Colectivamente, este trabajo indica que *ApoE*, como un único gen, podría actuar probablemente como un biomarcador de pronóstico y predictivo en melanomas primarios para identificar a pacientes que i.) están en riesgo de recidiva metastásica de melanoma y como tal ii.) podrían obtener un beneficio clínico de la inducción de *ApoE* mediada por un agonista de LXRβ.

Ejemplo 19 *La terapia de activación de LXRβ suprime el crecimiento de melanomas resistentes a dacarbazina y vemurafenib*

Animados por la capacidad robusta de la terapia de activación de LXRβ para suprimir el crecimiento tumoral y metástasis de melanoma en un amplio rango de líneas de melanoma con diversos fondos mutacionales, a continuación buscamos determinar si los melanomas que son resistentes a dos de los agentes clínicos principales usados en la gestión del melanoma metastásico - dacarbazina y vemurafenib - podrían responder a la terapia de activación de LXRβ.

Para este fin, generamos clones de B16F10 resistentes a dacarbazina (DTIC) mediante el cultivo continuo de células de melanoma en presencia de DTIC durante dos meses. Esto rindió una población de células que presentaba un incremento de 7 veces en la viabilidad en respuesta al tratamiento con alta dosis de DTIC comparado con la línea celular B16F10 parental (Figura 31A). Para confirmar que este clon de DITC derivado *in vitro* también era resistente a DTIC *in vivo*, evaluamos los efectos del tratamiento con dacarbazina en el crecimiento tumoral.

Aunque la dacarbazina suprimió significativamente el crecimiento de la línea parental sensible a DTIC (Figura 31B), no afectó el crecimiento tumoral por las células B16F10 resistentes a DTIC (Figura 31C). GW3965 **2** suprimió de forma robusta el crecimiento tumoral por el clon de melanoma B16F10 resistente a DTIC más del 70% (Figuras 31C-D). De forma importante, la administración oral de GW3965 **2** también inhibió fuertemente el crecimiento de tumores de

melanoma humano resistentes a DTIC derivados *in vivo* formados por la línea celular MeWo independiente (Figura 31E-F y Figura 32A).

Estos resultados revelan que el agonismo de LXRβ es efectivo para suprimir múltiples poblaciones de células de melanoma que son resistentes a dacarbazina - el único quimioterapéutico citotóxico aprobado por la FDA en melanoma metastásico. Nuestros descubrimientos tienen implicaciones clínicas importantes para el tratamiento del melanoma ya que todos los pacientes en estadio IV que se tratan con dacarbazina progresan finalmente desarrollando tumores que son resistentes a este agente.

Ensayamos el impacto de la terapia de activación de LXRβ en células de melanoma resistentes al inhibidor de quinasa B-Raf aprobado recientemente, vemurafenib- un régimen que muestra actividad frente a melanomas mutantes para *B-Raf* (Bollag *et al.*, 2010; Sosman *et al.*, 2012). Numerosos investigadores han derivado líneas de melanoma resistentes a vemurafenib (Poulikakos *et al.*, 2011; Shi et al, 2012, Das Thakur et al, 2013). El tratamiento con GW3965 **2** suprimió el crecimiento de la línea resistente a vemurafenib SK-Mel-239 derivada previamente un 72% (Figura 31G) y prolongó significativamente la supervivencia de ratones que portaban carga de melanoma resistente a vemurafenib (Figura 31H). Nuestros descubrimientos de estudios farmacológicos, moleculares y genéticos combinados en diversos modelos preclínicos de melanoma establecen que el direccionamiento de LXRβ es una nueva estrategia terapéutica que suprime de forma robusta el crecimiento tumoral y la metástasis de melanoma a través de la inducción transcripcional de *ApoE* - un supresor clave de la invasión y angiogénesis metastásica del melanoma (Pencheva *et al.*, 2012; Figura 31I).

Ejemplo 20 *El tratamiento con ApoE inhibe la invasión de células tumorales y el reclutamiento endotelial en múltiples tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de células renales y cáncer pancreático*

Con el fin de determinar si el tratamiento con ApoE podría ser efectivo para tratar tipos de cáncer además de melanoma, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto del tratamiento con ApoE en varias líneas celulares de cáncer diferentes, incluyendo líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de células renales, y cáncer pancreático (Figura 33).

La capacidad de las células cancerosas de invadir a través de matrigel *in vitro* se ensayó usando un sistema de cámaras de invasión de matrigel trans-well (354480, BD Biosciences). Se privó de suero a varias líneas celulares de cáncer toda la noche en medio que contenía FBS al 0,2%. Al día siguiente, se preequilibraron las cámaras de invasión antes del ensayo mediante la adición de 0,5 ml de medio de privación a los pocillos superiores e inferiores. Mientras tanto, las células cancerosas se tripsinizaron y las células viables se contaron usando la tinción de exclusión de células muertas con azul de tripán. Las células cancerosas se resuspendieron entonces a una concentración de 1 x 10^5 células/1 ml de medio de privación, y se sembraron 0,5 ml de suspensión celular, que contenía 5 x 10^4 células en cada trans-well. Para determinar el efecto de ApoE recombinante en la invasión de las células cancerosas, se añadieron ApoE3 humana recombinante (4696, Biovision) o BSA a cada trans-well a 100 µg/ml al inicio del ensayo. El ensayo de invasión se dejó proceder durante 24 horas a 37 °C. Después de la compleción del ensayo, los insertos se lavaron en PBS, las células que no invadieron se rasparon suavemente del lado superior de cada inserto usando puntas q, y las células que invadieron en el lado basal del inserto se fijaron en PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los insertos se lavaron en PBS y se cortaron entonces y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje VectaShield que contenía la tinción nuclear DAPI (H-1000, Vector Laboratories). Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

De hecho, el tratamiento con ApoE inhibió tanto la invasión de células tumorales como el reclutamiento endotelial en los tres de estos tipos de cáncer (Figura 33A-I).

Ejemplo 21 *Los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881, inducen la expresión de ApoE en células de melanoma humano*

Dado que la activación de ApoE por tratamiento con los agonistas de LXR GW3965 **2** y T0901317 **1** dio lugar a un beneficio terapéutico para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis, a continuación examinamos la capacidad de otros agonistas de LXR para inducir la expresión de ApoE en líneas celulares de melanoma humano (Figura 34).

Para determinar el efecto de los varios agonistas de LXR (LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en la expresión de ApoE en las células de melanoma, se sembraron 1 x 10^5 células de melanoma humano MeWo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se añadió DMSO o el agonista de LXR respectivo al medio celular a una concentración de 500 nM, 1 µM, o 2 µM, como se indica, y las células se incubaron en presencia de DMSO o el fármaco durante 48 horas a 37 °C. La cantidad total de DMSO añadida al medio celular se mantuvo por debajo del 0,2%. Se extrajo ARN de lisados celulares completos usando el kit de Purificación de ARN Total (17200, Norgen). Para cada muestra, se transcribieron de forma inversa 600 ng de ARN en ADNc usando el kit de Síntesis de la Primera Cadena de ADNc (Invitrogen). Se mezclaron aproximadamente, 200 ng de ADNc con Mezcla Maestra SYBR® verde de PCR y los cebadores directos e inversos correspondientes específicos para la detección de ApoE humana. Cada reacción se llevó a cabo en cuadruplicado, y los niveles de expresión del ARNm de ApoE se midieron

por amplificación con PCR cuantitativa en tiempo real usando un Sistema de PCR en Tiempo Real ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). La expresión relativa de ApoE se determinó usando el método ΔΔCt. Se usó GAPDH como un control endógeno para propósitos de normalización.

De hecho, tratamiento con los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO- 2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 dio lugar en todos los casos a grados variados de inducción de la expresión de ApoE. (Figura 34A-C).

Ejemplo 22 *El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 inhibe la invasión de células tumorales in vitro de cáncer renal, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón*

Hemos demostrado que el tratamiento con agonistas de LXR daba lugar a la inhibición de la invasión de células tumorales de melanoma. Dado que este efecto está mediado por la activación de la expresión de ApoE, establecimos la hipótesis de que el tratamiento con agonistas de LXR daría lugar a la inhibición de la invasión *in vitro* de células tumorales en cáncer de mama, cáncer pancreático, y cáncer renal, ya que estos tipos de cáncer son capaces de responder al tratamiento con ApoE. Con el fin de ensayar esta hipótesis, realizamos ensayos *in vitro* de invasión de células tumorales mediante el tratamiento de líneas celulares de cáncer de mama, cáncer pancreático, y cáncer de células renales con el agonista de LXR GW3965 **2** (Figura 35).

Varias líneas celulares (5 x 10^4 células de cáncer renal humano RCC, 5 x 10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1, y 5 x 10^4 células de cáncer de pulmón humano H460) se trataron con DMSO o GW3965 a 1 μM durante 56 horas. Las células se privaron de suero durante 16 horas en medio con FBS al 0,2% en presencia de DMSO o GW3965. Después de la privación de suero, las células se sometieron al ensayo de invasión trans-well usando un sistema de cámaras de invasión de matrigel (354480, BD Biosciences). Las cámaras de invasión se preequilibraron antes del ensayo mediante la adición de 0,5 ml de medio de privación a los pocillos superiores e inferiores. Mientras tanto, las células cancerosas se tripsinizaron y las células viables se contaron usando azul de tripán. Las células cancerosas se resuspendieron entonces a una concentración de 1 x 10^5 células/1 ml de medio de privación, y se sembraron 0,5 ml de suspensión celular, que contenía 5 x 10^4 células en cada trans-well. El ensayo de invasión se dejó proceder durante 24 horas a 37 °C. Después de la compleción del ensayo, los insertos se lavaron en PBS, las células que no invadieron se rasparon suavemente del lado superior de cada inserto usando puntas q, y las células que invadieron en el lado basal del inserto se fijaron en PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los insertos se lavaron en PBS y se cortaron entonces y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje VectaShield que contenía la tinción nuclear DAPI (H-1000, Vector Laboratories). Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

De hecho, el tratamiento con GW3965 **2** dio lugar a la inhibición de la invasión de células tumorales en los tres tipos de cáncer ensayados (Figura 35A-C). Esto demostró adicionalmente el amplio potencial terapéutico de los agonistas de LXR para tratar varios tipos de cáncer.

Ejemplo 23 *El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 inhibe el crecimiento tumoral del cáncer de mama in vivo*

Hemos demostrado que los agonistas de LXR inhiben los fenotipos de progresión de cáncer *in vitro* en el cáncer de mama, cáncer pancreático, y cáncer renal. Para investigar si el tratamiento con agonistas de LXR inhibe el crecimiento tumoral primario del cáncer de mama *in vivo*, ratones a los que se habían inyectado células de cáncer de mama humano MDA-468 se trataron bien con una dieta control o con una dieta suplementada con el agonista de LXR GW3965 **2** (Figura 36).

Para determinar el efecto de GW3965 **2** administrado oralmente en el crecimiento tumoral del cáncer de mama, se resuspendieron 2 x 10^6 células de cáncer de mama humano MDA-468 en 50 μL de PBS y 50 μL de matrigel y la suspensión celular se inyectó en ambos panículos adiposos mamarios inferiores de ratones hembra Nod Scid gamma de 7 semanas de edad. Los ratones se asignaron a un tratamiento con dieta control o un tratamiento con una dieta suplementada con GW3965 (75 mg/kg/día) dos días antes de la inyección de las células cancerosas. El compuesto farmacéutico GW3965 **2** se formuló en la dieta de los ratones por Research Diets, Inc. Las dimensiones tumorales se midieron usando calibradores digitales, y el volumen tumoral se calculó como (diámetro pequeño)^2 x (diámetro grande)/2.

El tratamiento con GW3965 dio lugar a una reducción significativa en el tamaño tumoral del cáncer de mama *in vivo* (Figura 36).

EJEMPLO 24 *Efectos del tratamiento con los agonistas de LXR LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en los fenotipos de progresión de melanoma in vitro*

Hemos demostrado la capacidad de varios agonistas de LXR para inducir la expresión de ApoE con potencia variada en células de melanoma (Figura 34). Como el efecto terapéutico de los agonistas de LXR sobre el cáncer es a través de la activación de la expresión de ApoE, establecimos la hipótesis de que la potencia terapéutica de cualquier agonista de LXR dado está correlacionada directamente con su capacidad de inducir la expresión de ApoE. Para confirmar

esto, cuantificamos el efecto del tratamiento con varios agonistas de LXR en el reclutamiento endotelial y la invasión de células tumorales de células de melanoma *in vitro*. Como se muestra en la Figura 37, el grado en el cual los agonistas de LXR inhiben los fenotipos de progresión del cáncer *in vitro* está relacionado con la potencia de inducción de ApoE del agonista de LXR.

Invasión celular: se trataron células de melanoma humano MeWo con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 a 1 µM cada uno durante 56 horas. Las células se privaron de suero durante 16 horas en medio con FBS al 0,2% en presencia de cada fármaco correspondiente o DMSO. Después de la privación de suero, las células se sometieron al ensayo de invasión trans-well usando un sistema de cámaras de invasión de matrigel (354480, BD Biosciences). Las cámaras de invasión se preequilibraron antes del ensayo mediante la adición de 0,5 ml de medio de privación a los pocillos superiores e inferiores. Mientras tanto, las células cancerosas se tripsinizaron y las células viables se contaron usando azul de tripán. Las células cancerosas se resuspendieron entonces a una concentración de 1 x 10^5 células/1 ml de medio de privación, y se sembraron 0,5 ml de suspensión celular, que contenía 5 x 10^4 células, en cada trans-well. El ensayo de invasión se dejó proceder durante 24 horas a 37 °C. Después de la compleción del ensayo, los insertos se lavaron en PBS, las células que no invadieron se rasparon suavemente del lado superior de cada inserto usando puntas q, y las células que invadieron en el lado basal del inserto se fijaron en PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los insertos se lavaron en PBS, se cortaron y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje VectaShield que contenía la tinción nuclear DAPI (H-1000, Vector Laboratories). Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

Reclutamiento endotelial: se trataron células de melanoma humano MeWo con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 a 1 µM cada uno durante 56 horas. Posteriormente, se sembraron 5 x 10^4 células cancerosas en placas de 24 pocillos en presencia de cada fármaco o DMSO y se dejó que se adhirieran durante 16 horas antes de empezar el ensayo. Se privaron de suero células endoteliales de la vena umbilical humana (células HUVEC) en medio que contenía FBS al 0,2 % toda la noche. Al día siguiente, se sembraron 1 x 10^5 células HUVEC en un inserto de 3,0 µm HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon) ajustado en cada pocillo que contenía las células cancerosas en la parte inferior. Se dejó que las células HUVEC migraran hacia las células cancerosas durante 20 horas, después de lo cual los insertos se lavaron en PBS, se fijaron en PFA al 4%, se marcaron con DAPI, y se montaron en portaobjetos. Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

Los agonistas de LXR que inducen potentemente la expresión de ApoE (p. ej., WO-2010-0138598 Ej. 9 y SB742881) son más efectivos para inhibir los fenotipos de progresión del cáncer (Figura 37) que los agonistas de LXR con menor potencia. Esto demuestra adicionalmente que el beneficio terapéutico del tratamiento con agonistas de LXR para el cáncer es un resultado de la inducción de ApoE.

Ejemplo 25 *El tratamiento con agonistas de LXR inhibe el crecimiento tumoral de melanoma in vivo*

Hemos demostrado que los agonistas de LXR que inducen la expresión de ApoE inhiben la actividad tumoral *in vitro*. Para confirmar si estos agonistas inhiben el crecimiento tumoral de melanoma *in vivo*, ratones a los que se inyectaron células de melanoma B16F10 se trataron bien con *LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881.*

Para evaluar el efecto de LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 administrados oralmente en el crecimiento tumoral del melanoma, se resuspendieron 5 x 10^4 células de melanoma de ratón B16F10 en 50 µl de PBS y 50 µl de matrigel y la suspensión celular se inyectó por vía subcutánea en ambos flancos dorsales inferiores de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad. Los ratones se palparon diariamente para detectar la formación de tumores y después de la detección de tumores con un volumen de 5-10 m^3, los ratones se asignaron a un pienso control o un pienso que contenía cada agonista de LXR respectivo: LXR-623 (20 mg/kg/día), WO-2007-002563 Ej. 19 (100 mg/kg/día), WO-2010-0138598 Ej. 9 (10 mg/kg/día o 100 mg/kg/día), o SB742881 (100 mg/kg/día). Los compuestos farmacéuticos de LXR se formularon en el pienso de los ratones por Research Diets, Inc. Las dimensiones tumorales se midieron usando calibradores digitales, y el volumen tumoral se calculó como (diámetro pequeño)^2 x (diámetro grande)/2.

Consistente con nuestros datos *in vitro*, los agonistas de LXR que inducen potentemente la expresión de ApoE *in vitro* (WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881) inhibieron significativamente el crecimiento tumoral primario del melanoma *in vivo* (Figura 38). Esto también es consistente con nuestros resultados que demuestran que otros agonistas de LXR que inducen potentemente la expresión de ApoE (GW3965 **2**, T0901317 **1**) también inhiben el crecimiento tumoral primario *in vivo* (Figura 21).

De acuerdo con esto, los ejemplos anteriores se centraron en la caracterización de los mecanismos moleculares y celulares mediante los que ejerce sus efectos. Para este fin, se encontró que ApoE está dirigido a dos receptores distintos, pero homólogos, en dos tipos de células diversos. La ApoE que actúa en los receptores LRP1 de células de

melanoma inhibe la invasión del melanoma, mientras su acción en los receptores LRP8 de células endoteliales suprime la migración endotelial. Los resultados de los análisis de pérdida de función, ganancia de función, epistasis, correlación clínica, y selección de la expresión de derivados *in vivo* dieron lugar a un modelo en donde tres miARN tienen como diana de manera convergente una red supresora de la metástasis para limitar la secreción de ApoE, suprimiendo así la señalización de ApoE/LRP1 en células de melanoma y la señalización de ApoE/LRP8 en células endoteliales (Figura 7K). Aunque los análisis sistemáticos anteriores han identificado ApoE y DNAJA4 como dianas clave y mediadores directos de los fenotipos metastásicos regulados por estos miARN, no puede excluirse que los tres miARN puedan retener individualmente genes diana adicionales cuyo silenciamiento pueda contribuir a la progresión metastásica. La capacidad de la inactivación de ApoE o DNAJA4 de rescatar completamente los fenotipos de supresión de la metástasis observados con el silenciamiento de miARN individuales, sin embargo, sugiere fuertemente que estos genes son moduladores clave de los efectos dependientes de los miARN en la metástasis.

Los resultados anteriores revelan una evidencia combinada molecular, genética e *in vivo* para un papel requerido y suficiente para ApoE en la supresión de la progresión metastásica del melanoma. La ApoE puede distribuirse en el sistema circulatorio tanto en un estado unido a lipoproteínas como libre de lípidos (Hatters *et al.*, 2006). Aunque se ha mostrado que la ApoE recombinante libre de lípidos es suficiente para suprimir la invasión y migración endotelial del melanoma, es posible que la ApoE contenida en partículas de lipoproteínas también pueda suprimir la invasión y el reclutamiento endotelial del melanoma. La capacidad de ApoE recombinante de inhibir estos fenotipos prometastásicos, así como los fenotipos incrementados de invasión y reclutamiento endotelial del melanoma observados con la neutralización de ApoE mediada por anticuerpo sugiere que la molécula de ApoE en sí misma es el mediador clave de estos fenotipos. Consistente con los descubrimientos descritos en la presente memoria, se encontró previamente que un fragmento peptídico sintético de ApoE inhibía la migración endotelial a través de mecanismos desconocidos (Bhattacharjee *et al.*, 2011). Los descubrimientos descritos en la presente memoria son consistentes con un papel para la ApoE secretada por células de melanoma y endógena sistémica en la inhibición del reclutamiento endotelial, que no es secundario a un crecimiento alterado de las células endoteliales.

Los estudios moleculares, genéticos, e *in vivo* descritos anteriormente revelan un papel para la ApoE derivada de cáncer endógena en la modulación de la migración endotelial y angiogénesis cancerosa a través de la señalización del receptor LRP8 endotelial. Este fenotipo robusto de reclutamiento endotelial no autónomo de células mediado por la señalización de ApoE/LRP8 sugiere que ApoE también puede modular la angiogénesis metastásica en otros tipos de cáncer, y dicho papel general para ApoE en la biología de la angiogénesis cancerosa permanece por explorar. La ApoE es una molécula polimórfica con papeles bien establecidos en trastornos lipídicos, cardiovasculares, y neurodegenerativos. Sus tres variantes principales, ApoE2, ApoE3, y ApoE4, presentan representaciones variadas en la población humana, siendo ApoE3 la variante más común (Hatters *et al.*, 2006). Las tres isoformas se diferencian en los residuos 112 y 158 en el dominio N- terminal, que contiene el dominio de unión a receptor de ApoE. Se piensa que estas variaciones estructurales dan lugar a distintos atributos funcionales entre las variantes. Consistente con esto, las tres isoformas de ApoE se diferencian en su afinidad de unión para los miembros de la familia de receptores de LDL, preferencia de unión a lipoproteínas, y estabilidad del extremo N. Concretamente, ApoE2 tiene una capacidad de unión al receptor de LDL que está atenuada 50 a 100 veces comparada con ApoE3 y ApoE4 (Weisgraber *et al.*, 1982), mientras ApoE4, a diferencia de las otras dos variantes, se une preferentemente a lipoproteínas grandes de menor densidad (Weisgraber et al, 1990) y presenta la menor estabilidad en el extremo N (Morrow *et al.*, 2000). Estas diferencias funcionales confieren propiedades patofisiológicas para la seleccionar las isoformas de ApoE. Mientras ApoE3, encontrada en el 78% de la población, se considera un alelo neutro, ApoE2 está asociada con hiperlipoproteinemia de tipo III (Hatters *et al.*, 2006) y ApoE4 representa el factor genético de riesgo principal conocido para la enfermedad de Alzheimer (Corder *et al.*, 1993) y también se correlaciona con un incremento modesto en el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (Luc et al, 1994). Dado que las múltiples líneas celulares de melanoma humano analizadas en el estudio anterior son homocigotas para el alelo de ApoE3, así como la capacidad de ApoE3 recombinante de inhibir la invasión y el reclutamiento endotelial del melanoma, los descubrimientos anteriores son consistentes con que ApoE3 sea suficiente y se requiera para la supresión de la progresión metastásica del melanoma. Sin embargo, será interesante en el futuro determinar si ApoE2 y ApoE4 pueden modular estos fenotipos prometastásicos en un grado similar al de ApoE3 y si los genotipos específicos de ApoE confieren un riesgo aumentado para la progresión metastásica del melanoma.

Además de la resección quirúrgica de lesiones de melanoma primarias, actualmente no hay terapias efectivas para la prevención de las metástasis de melanoma con la terapia con interferón incrementando las tasas de supervivencia global a los 5 años un escaso 3% sobre la base de meta-análisis, mientras la demostración de los datos de ensayos de fase III respecto a beneficios significativos en la supervivencia están todavía pendientes (Garbe *et al.*, 2011). El aumento dramático de la progresión metastásica del melanoma en el contexto de la ablación genética de ApoE sistémica sugiere que la modulación de los niveles de ApoE puede tener implicaciones terapéuticas significativas para el melanoma - una enfermedad que es responsable de aproximadamente 48.000 muertes al año globalmente (Lucas et al, 2006). Dada la capacidad robusta de ApoE para suprimir la invasión, migración endotelial, angiogénesis metastásica, y colonización metastásica del melanoma, las estrategias terapéuticas dirigidas a la inducción farmacológica de los niveles de ApoE endógena pueden reducir significativamente las tasas de mortalidad por melanoma al disminuir la incidencia metastásica.

La estrategia basada en la selección *in vivo* no sesgada descrita anteriormente dio lugar al descubrimiento de miARN desrregulados que promueven sinérgicamente y dramáticamente la metástasis por las células cancerosas de líneas celulares de melanoma de pacientes independientes que representaban tanto melanomas melanóticos como amelanóticos. Aunque miR-1908 no se ha caracterizado previamente, miR-199a se ha implicado en el carcinoma hepatocelular (Hou *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2010) y el osteosarcoma (Duan *et al.*, 2011) que, al contrario que el melanoma, presentan una regulación a la baja de los niveles de expresión de miR-199a. Estas diferencias son consistentes con los perfiles de expresión específicos de tejido establecidos de miARN en varios tipos de cáncer. La identificación de miR-199a como un promotor de la metástasis de melanoma está apoyada por un estudio previo de asociación clínica que revela que niveles incrementados de miR-199a se correlacionan con la progresión del melanoma uveal (Worley et al, 2008), lo que sugiere que la expresión inducida de miR-199a puede ser una característica que define el melanoma metastásico independientemente del sitio de origen. Estudios previos han implicado a miARN adicionales en la promoción de la progresión metastásica del melanoma tales como miR-182 (Segura *et al.*, 2009), miR-214 (que estaba regulado al alza en células metastásicas de melanoma, pero no actuaban funcionalmente en los estudios anteriores; Penna *et al.*, 2011), y miR-30b/miR-30d (Gaziel-Sovran *et al.*, 2011). Se ha reportado que cada uno de estos miARN modula solo modestamente la metástasis de melanoma, dando lugar a una modulación de la metástasis incrementada o disminuida 1,5 a 2 veces después de la sobreexpresión o inactivación de los miARN, respectivamente. A diferencia de esto, la sobreexpresión de cualquiera de miR-199a o miR-1908 aumentó la metástasis 9 veces (Figura 1C), mientras la inactivación combinatoria de miARN suprimió sinérgicamente la metástasis de melanoma más de 70 veces (Figura 7E). Por lo tanto, el estudio descrito en la presente memoria representa el primer descubrimiento sistemático de múltiples miARN que de forma convergente y robusta promueven la metástasis del melanoma humano, así como el primero en asignar papeles duales autónomos de células/no autónomos de células a miARN endógenos reguladores de la metástasis en el cáncer.

Los análisis sistemáticos previos de miARN en cáncer de mama revelaron principalmente una disminución en los niveles de expresión de múltiples microARN en células de cáncer de mama metastásico seleccionadas *in vivo* (Tavazoie *et al.*, 2008). Estos descubrimientos fueron consistentes con el descubrimiento posterior de muchos miARN supresores de metástasis adicionales en cáncer de mama (Shi *et al.*, 2010; Wang y Wang, 2011), la identificación de varios miARN como dianas transcripcionales directas del supresor tumoral p53 (He et al, 2007), la regulación a la baja de miARN en cáncer de mama respecto a tejidos normales (Calin y Groce, 2006; Iorio *et al.*, 2005), la regulación a la baja de drosha y dicer en cáncer de mama (Yan *et al.*, 2011) y cáncer de mama metastásico (Grelier *et al.*, 2011), así como los efectos protumorogénicos y prometastásicos del silenciamiento global de miARN a través de la inactivación de dicer (Kumar et al, 2007; Kumar et al, 2009; Martello et al, 2010; Noh et al, 2011). A diferencia del cáncer de mama, los descubrimientos anteriores en melanoma revelan un conjunto de miARN regulados al alza en melanoma humano metastásico, dando lugar a la posibilidad intrigante de que el procesamiento de los miARN puede actuar realmente de una manera protumorogénica y prometastásica en el melanoma. Consistente con esto, dicer se requiere para el desarrollo melanocítico (Levy et al, 2010), y se ha encontrado recientemente que la expresión de dicer se correlaciona positivamente con la progresión del melanoma humano en un estudio clínico-patológico (Ma et al, 2011). Estos descubrimientos, cuando se integran con los descubrimientos descritos aquí, motivan futuros estudios para investigar el requerimiento funcional de dicer (Bernstein *et al.*, 2001) en la metástasis de melanoma.

El establecimiento de modelos de selección *in vivo* de metástasis de melanoma melanocítico y amelanocítico ha permitido identificar los fenotipos celulares presentados por las células de melanoma altamente metastásico. El trabajo revela que, además de una capacidad de invasión aumentada, la capacidad de las células de melanoma para reclutar células endoteliales está aumentada significativamente en células de melanoma altamente metastásico respecto a células de melanoma poco metastásico. Adicionalmente, se encontró que tres reguladores principales de la metástasis posteriores a la transcripción median fuertemente el reclutamiento endotelial. Se encontró además que la ruta de señalización aguas abajo modulada por estos miARN también regula el reclutamiento endotelial. Estos descubrimientos revelan que el reclutamiento endotelial es una característica que define a las células de melanoma metastásico. Recientemente, también se ha encontrado que la capacidad aumentada de reclutamiento endotelial es una característica que define al cáncer de mama metastásico, en donde la supresión de metástasis por miR-126 estaba mediada a través del direccionamiento de miARN a dos rutas de señalización distintas que promueven el reclutamiento endotelial (Png *et al.*, 2012). En el cáncer de mama, el reclutamiento endotelial incrementó la probabilidad de inicio metastásico en lugar del crecimiento tumoral. De forma similar, los miARN promotores de metástasis de melanoma estudiados aquí aumentaron dramáticamente la colonización metastásica, sin aumentar el crecimiento tumoral primario, e incrementaron el número de nódulos metastásicos - consistente con un papel de estos miARN y su red reguladora en el inicio metastásico en lugar de en la promoción del crecimiento tumoral. Tomados conjuntamente, estos descubrimientos son consistentes con que el reclutamiento endotelial en el nicho metastásico actúa como un promotor del inicio y la colonización metastásica en estos distintos tipos de cáncer epitelial. Dicho papel no canónico para las células endoteliales en la progresión del cáncer estaría enfrentado al papel establecido de las células endoteliales en el aumento angiogénico de la activación del suministro de sangre del crecimiento tumoral aumentado. Se sabe que las células endoteliales juegan dichos papeles no canónicos en el desarrollo mediante el suministro de señales a las células vecinas durante la organogénesis (Lammert et al, 2001). Recientemente, también se ha mostrado que dichas señales promueven la regeneración de órganos (Ding et al, 2011; Ding et al, 2010; Kobayashi et al, 2010). Es necesario un trabajo futuro para determinar los factores estimuladores de metástasis proporcionados por las células endoteliales que catalizan el inicio metastásico.

La capacidad de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 para predecir individualmente la supervivencia sin metástasis en una cohorte de pacientes con melanoma indica la significancia de cada miARN como un predictor clínico de la progresión de cáncer de melanoma. De forma importante, la capacidad dramática y altamente significativa de la firma agregada de los tres miARN (Figura 7D) para estratificar a pacientes con alto riesgo respecto a aquellos esencialmente sin riesgo para recidiva metastásica revela tanto la cooperatividad de estos miARN, así como su potencial clínico como biomarcadores de melanoma (Sawyers, 2008) para identificar el subconjunto de pacientes que podría beneficiarse de la terapia de inhibición de miARN. El direccionamiento terapéutico de los miARN ha obtenido un impulso a través del uso de LNA *in vivo* que se ha mostrado que antagonizan miARN en ratones (Elmer *et al.*, 2008(b); Krutzfeldt et al, 2005; Obad et al, 2011) y primates (Elmer et al, 2008(a)) y actualmente se están ensayando en ensayos clínicos en seres humanos. La potente capacidad de pronóstico de los tres miARN, una demostración de prueba de principio de la prevención sinérgica robusta de la metástasis conseguida tratando células de melanoma altamente metastásicas con una mezcla de LNA dirigidos a miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 (Figura 7E), así como el efecto supresor de la metástasis de LNA optimizados *in vivo* administrados terapéuticamente dirigidos a estos miARN (Figura 7J) motivan estudios clínicos futuros con el objetivo de determinar el potencial terapéutico del direccionamiento combinatorio de estos miARN prometastásicos y proangiogénicos en pacientes con alto riesgo de metástasis de melanoma - un resultado que actualmente carece de opciones quimioterapéuticas efectivas.

Lista de secuencias

<110> THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

<120> MicroARN que suprime el melanoma humano

<130> JA77289P.EPPD1

<140>
<141> 13-08-2013

<150> EP13829165.3
<151> 13-08-2013

<150> PCT/US13/54690
<151> 13-08-2013

<150> 61/784,057
<151> 14-03-2013

<150> 61/682,339
<151> 13-08-2013

<160> 141

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1223
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

gggatccttg agtcctactc agccccagcg gaggtgaagg acgtccttcc ccaggagccg 60

actggccaat cacaggcagg aagatgaagg ttctgtgggc tgcgttgctg gtcacattcc 120

tggcaggatg ccaggccaag gtggagcaag cggtggagac agagccggag cccgagctgc 180

gccagcagac cgagtggcag agcggccagc gctgggaact ggcactgggt cgcttttggg 240

attacctgcg ctgggtgcag acactgtctg agcaggtgca ggaggagctg ctcagctccc 300

aggtcaccca ggaactgagg gcgctgatgg acgagaccat gaaggagttg aaggcctaca 360

aatcggaact ggaggaacaa ctgaccccgg tggcggagga gacgcgggca cggctgtcca 420

aggagctgca ggcggcgcag gcccggctgg gcgcggacat ggaggacgtg tgcggccgcc 480

tggtgcagta ccgcggcgag gtgcaggcca tgctcggcca gagcaccgag gagctgcggg 540

tgcgcctcgc ctcccacctg cgcaagctgc gtaagcggct cctccgcgat gccgatgacc 600

tgcagaagcg cctggcagtg taccaggccg gggcccgcga gggcgccgag cgcggcctca 660

gcgccatccg cgagcgcctg gggcccctgg tggaacaggg ccgcgtgcgg gccgccactg 720

tgggctccct ggccggccag ccgctacagg agcgggccca ggcctggggc gagcggctgc 780

gcgcgcggat ggaggagatg ggcagccgga cccgcgaccg cctggacgag gtgaaggagc 840

aggtggcgga ggtgcgcgcc aagctggagg agcaggccca gcagatacgc ctgcaggccg 900

aggccttcca ggcccgcctc aagagctggt tcgagcccct ggtggaagac atgcagcgcc 960

agtgggccgg gctggtggag aaggtgcagg ctgccgtggg caccagcgcc gcccctgtgc 1020

ccagcgacaa tcactgaacg ccgaagcctg cagccatgcg accccacgcc accccgtgcc 1080

tcctgcctcc gcgcagcctg cagcgggaga ccctgtcccc gccccagccg tcctcctggg 1140

gtggacccta gtttaataaa gattcaccaa gtttcacgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1223

<210> 2
<211> 317
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
100 105 110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
165 170 175

```
Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
            180                 185                 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
        195                 200                 205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
    210                 215                 220

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
225                 230                 235                 240

Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
                245                 250                 255

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
            260                 265                 270

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
        275                 280                 285

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
    290                 295                 300

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
305                 310                 315
```

<210> 3
<211> 3203
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
agucccaccc uucggcgcag ggcuccggcc aacacagccc uccaggccgc cuacucucca       60

gccagccggc uccacggacc cacggaaggg caaggggggcg gccucggggc ggcgggacag      120

uugucggagg gcgcccucca ggcccaagcc gccuucuccg gccccgccca uggcccgggg      180

cggcagucag agcuggagcu ccggggaauc agacgggcag ccaaaggagc agacgcccga      240

gaagcccaga cacaagaugg ugaaggagac ccaguacuau gacauccugg gcgugaagcc      300

cagcgcgucc ccggaggaga ucaagaaggc cuaucggaag cuggcgcuca aguaccaccc      360

ggacaagaac ccggaugagg gcgagaaguu uaaacucaua ucccaggcau augaagugcu      420

uucagaucca aagaaaaggg auguuuauga ccaaggcgga gagcaggcaa uuaaagaagg      480

aggcucaggc agccccagcu ucucuucacc cauggacauc uuugacaugu ucuuuggugg      540

ugguggacgg auggcuagag agagaagagg caagaauguu guacaccagu uaucuguaac      600
```

ucuugaagau cuauauaaug gagucacgaa gaaauuggcc cuccagaaaa auguaauuug 660

ugagaaaugu gaagguguug gugggaagaa gggaucggug gagaagugcc cgcugugcaa 720

ggggcggggg augcagaucc acauccagca gaucgggccg ggcaugguac agcagaucca 780

gaccgugugc aucgagugca agggccaggg ugagcgcauc aaccccaagg accgcugcga 840

gagcugcagc ggggccaagg ugauccguga gaagaagauu aucgagguac auguugaaaa 900

agguaugaaa gaugggcaaa agauacuauu ucauggagaa ggagaucagg agccugagcu 960

ggagccuggu gaugucauaa uugugcuuga ucagaaggau cauagugucu uucagagacg 1020

aggccaugac uugaucauga aaaugaaaau ucagcuuucu gaagcucuuu guggcuucaa 1080

gaagacgaua aaaacauugg acaaucgaau ucuuguuauu acauccaaag caggugaggu 1140

gauaaagcac ggggaccuga gaugcgugcg cgaugaagga augcccaucu acaaagcacc 1200

ccuggaaaaa gggauucuga ucauacaguu uuuaguaauc uuuccugaaa aacacuggcu 1260

uucucuggaa aagcuuccuc agcuggaagc uuuacucccu ccucgacaga aagugaggau 1320

uacagaugac auggaucagg uggagcugaa ggaguuuugu cccaaugagc agaacuggcg 1380

ucagcacagg gaggccuacg aggaggacga agacgggccc caggcuggag ugcagugcca 1440

gacggcauga cguggugcgg ggcagcgugg ccccaccgga cuagcacaug augaauguaa 1500

aguuggcaca augaaaauga caucgcuuua auggccuugu guuugggaug uccuguguau 1560

guguucagca uucuuaauug cugagugucu uuuuggcuuu ucuuuugguu guaacuuaag 1620

uuauagcuua auuuauauuu aaauguuuua aguauaaauc accucuaguc ugcauaugga 1680

aucuguucau uucuauuuuc aggauauacu uuugagaugu cagugauugc accaauacuu 1740

ugugcuucua guggcuuugc cauaauucag ugucaccaau aaggcacagc ccaguuagca 1800

gcuuagcccc ccuagcaaac cccaaggcac aaaagugggca uccugacuca ucucuagguc 1860

uguggguuucu ccccucuucc cuuggcagag uuauugaggg caugaucuca gggcugcuaa 1920

gauaacauuu cugaggauuc uagaugaucc ucuuaaagaa uaaaagcaca uccguggauc 1980

ggacauggcu gcaugugccu gcuuaacagg gccaacuuag uuccuacugu ucugugcccu 2040

ucaguggaug gaacgugagu gucugaucau cucucuugga aguuuucuga accuuccaag 2100

cucuguggug aggacaaacc aguguuugaa ucauaugcug auaacuguuu gccugugacc 2160

cucacaccuu guucuucagg guuuuaauga uuuucuguug acaacuuuug caaugcuuuc 2220

ccaccaaagu gcuuacuugu aaagaaaacu aaauccuucu gugucccegg cagccucagu 2280

gcagcaacag aagccaaggg agaaugcugc ugguuuggcc cauggcacag ccagcuucuc 2340

ugaccaguaa uccgggguga cuugaggguc ugcaaaggca uagaacuccc caguguuuuc 2400

caccucauuc ucccagauug agcucccuuc caaaggaucg uuccucucau ugcacagcca 2460

uauuacaaag gguuuccugc ucaagugaug uuuugguaag aacuucgcug aguuccacug 2520

```
uggauuacag uuuguaugga cuacuacugu aaauuauagc uuguuuggag ggauauuagu     2580

cauuauuuua uucaugacag guagacuaca auucgaacuu aggguuaccu cagucuuuag     2640

ccauuacugc uuauuucuuu uccccaaguc acaaaaaacu uguaagcugc uggguuaaag     2700

cagaggccac cugucagauc uacccuaccc uuauuugguu acauggcacc ugagaguuuc     2760

acucagacca gggaucuucc uuaggagggu caaagugcag aucagaccau gcagguaagg     2820

ugaaccagcu gcacggacca gguucccgca aaacauugcc agcuagugag gcauaauuug     2880

cucaaaguau agaaacagcc caccugugcc cacuuugacc auuggugagg auagauauaa     2940

aaucacuucu uccaacgaag ccuaggugaa aaucuauuua uaaauggacc acaacucugg     3000

ggugucguuu uugugcugug acuuccuaau uauugcuaaa gaacuacugu uuaguuggua     3060

augguguaaa auuacauuca gcuccuucuu gucauauaaa aggaauuugg agggugucgc     3120

uuaaaauuuu auuccaccug uacauuuguc acuuuaaaau uaaaauugag cugguaugag     3180

agauaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                              3203
```

<210> 4
<211> 426
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Met Ala Arg Gly Gly Ser Gln Ser Trp Ser Ser Gly Glu Ser Asp Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Lys Glu Gln Thr Pro Glu Lys Pro Arg His Lys Met Val Lys
            20                  25                  30

Glu Thr Gln Tyr Tyr Asp Ile Leu Gly Val Lys Pro Ser Ala Ser Pro
        35                  40                  45

Glu Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Tyr His Pro
    50                  55                  60

Asp Lys Asn Pro Asp Glu Gly Glu Lys Phe Lys Leu Ile Ser Gln Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Asp Val Tyr Asp Gln Gly
                85                  90                  95

Gly Glu Gln Ala Ile Lys Glu Gly Gly Ser Gly Ser Pro Ser Phe Ser
            100                 105                 110

Ser Pro Met Asp Ile Phe Asp Met Phe Phe Gly Gly Gly Gly Arg Met
        115                 120                 125
```

```
Ala Arg Glu Arg Arg Gly Lys Asn Val Val His Gln Leu Ser Val Thr
    130                 135                 140

Leu Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Val Thr Lys Lys Leu Ala Leu Gln Lys
145                 150                 155                 160

Asn Val Ile Cys Glu Lys Cys Glu Gly Val Gly Gly Lys Lys Gly Ser
                165                 170                 175

Val Glu Lys Cys Pro Leu Cys Lys Gly Arg Gly Met Gln Ile His Ile
            180                 185                 190

Gln Gln Ile Gly Pro Gly Met Val Gln Gln Ile Gln Thr Val Cys Ile
        195                 200                 205

Glu Cys Lys Gly Gln Gly Glu Arg Ile Asn Pro Lys Asp Arg Cys Glu
    210                 215                 220

Ser Cys Ser Gly Ala Lys Val Ile Arg Glu Lys Lys Ile Ile Glu Val
225                 230                 235                 240

His Val Glu Lys Gly Met Lys Asp Gly Gln Lys Ile Leu Phe His Gly
                245                 250                 255

Glu Gly Asp Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Gly Asp Val Ile Ile Val
            260                 265                 270

Leu Asp Gln Lys Asp His Ser Val Phe Gln Arg Arg Gly His Asp Leu
        275                 280                 285

Ile Met Lys Met Lys Ile Gln Leu Ser Glu Ala Leu Cys Gly Phe Lys
    290                 295                 300

Lys Thr Ile Lys Thr Leu Asp Asn Arg Ile Leu Val Ile Thr Ser Lys
305                 310                 315                 320

Ala Gly Glu Val Ile Lys His Gly Asp Leu Arg Cys Val Arg Asp Glu
                325                 330                 335

Gly Met Pro Ile Tyr Lys Ala Pro Leu Glu Lys Gly Ile Leu Ile Ile
            340                 345                 350

Gln Phe Leu Val Ile Phe Pro Glu Lys His Trp Leu Ser Leu Glu Lys
        355                 360                 365

Leu Pro Gln Leu Glu Ala Leu Leu Pro Pro Arg Gln Lys Val Arg Ile
```

370 375 380

Thr Asp Asp Met Asp Gln Val Glu Leu Lys Glu Phe Cys Pro Asn Glu
385 390 395 400

Gln Asn Trp Arg Gln His Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Asp Glu Asp Gly
405 410 415

Pro Gln Ala Gly Val Gln Cys Gln Thr Ala
420 425

<210> 5
<211> 3064
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

gugaccguga cgcgcgagcg ggcggcgggg gcgcgggcca ggggcgcggg ccagggugcc 60

ggcaggggcg uccggggcgc ucugaccggc cucgcccgcc ccccccgcag acacaagaug 120

gugaaggaga cccaguacua ugacauccug ggcgugaagc ccagcgcguc cccggaggag 180

aucaagaagg ccuaucggaa gcuggcgcuc aaguaccacc cggacaagaa cccggaugag 240

ggcgagaagu uuaaacucau aucccaggca uaugaagugc uuucagaucc aaagaaaagg 300

gauguuuaug accaaggcgg agagcaggca auuaaagaag gaggcucagg cagccccagc 360

uucucuucac ccauggacau cuuugacaug uucuuuggug gugguggacg gauggcuaga 420

gagagaagag gcaagaaugu uguacaccag uuaucuguaa cucuugaaga ucuauauaau 480

ggagucacga agaaauuggc ccuccagaaa aauguaauuu gugagaaaug ugaagguguu 540

ggugggaaga agggaucggu ggagaagugc ccgcugugca aggggcgggg gaugcagauc 600

cacauccagc agaucgggcc gggcauggua cagcagaucc agaccgugug caucgagugc 660

aagggccagg gugagcgcau caaccccaag gaccgcugcg agagcugcag cggggccaag 720

gugauccgug agaagaagau uaucgaggua cauguugaaa aagguaugaa agaugggcaa 780

aagauacuau uucauggaga aggagaucag gagccugagc uggagccugg ugaugucaua 840

auugugcuug aucagaagga ucauaguguc uuucagagac gaggccauga cuugaucaug 900

aaaaugaaaa uucagcuuuc ugaagcucuu uguggcuuca agaagacgau aaaaacauug 960

gacaaucgaa uucuuguuau uacauccaaa gcaggugagg ugauaaagca cggggaccug 1020

agaugcgugc gcgaugaagg aaugcccauc uacaaagcac cccuggaaaa agggauucug 1080

aucauacagu uuuuaguaau cuuuccugaa aaacacuggc uuucucugga aaagcuuccu 1140

cagcuggaag cuuuacuccc uccucgacag aaagugagga uuacagauga cauggaucag 1200

guggagcuga aggaguuuug ucccaaugag cagaacuggc gucagcacag ggaggccuac 1260

gaggaggacg aagacgggcc ccaggcugga gugcagugcc agacggcaug acguggugcg 1320

gggcagcgug gccccaccgg acuagcacau gaugaaugua aaguuggcac aaugaaaaug 1380

acaucgcuuu aauggccuug uguuugggau guccugugua uguguucagc auucuuaauu 1440

gcugaguguc uuuuuggcuu uucuuuuggu uguaacuuaa guuauagcuu aauuuauauu 1500

uaaauguuuu aaguauaaau caccucuagu cugcauaugg aaucuguuca uuucuauuuu 1560

caggauauac uuuugagaug ucagugauug caccaauacu uugugcuucu aguggcuuug 1620

ccauaauuca gugucaccaa uaaggcacag cccaguuagc agcuuagccc cccuagcaaa 1680

ccccaaggca caaagugggc auccugacuc aucucuaggu cuguggguuc uccccucuuc 1740

ccuuggcaga guuauugagg gcaugaucuc agggcugcua agauaacauu ucugaggauu 1800

cuagaugauc cucuuaaaga auaaaagcac auccguggau cggacauggc ugcaugugcc 1860

ugcuuaacag ggccaacuua guuccuacug uucugugccc uucaguggau ggaacgugag 1920

ugucugauca ucucucuugg aaguuuucug aaccuuccaa gcucuguggu gaggacaaac 1980

caguguuuga aucauaugcu gauaacuguu ugccugugac ccucacaccu uguucuucag 2040

gguuuuaaug auuuucuguu gacaacuuuu gcaaugcuuu cccaccaaag ugcuuacuug 2100

uaaagaaaac uaaauccuuc uguguccccg gcagccucag ugcagcaaca gaagccaagg 2160

gagaaugcug cugguuuggc ccauggcaca gccagcuucu cugaccagua auccggggug 2220

acuugagggu cugcaaaggc auagaacucc ccaguguuuu ccaccucauu cucccagauu 2280

gagcucccuu ccaaaggauc guuccucuca uugcacagcc auauuacaaa ggguuuccug 2340

cucaagugau guuuugguaa gaacuucgcu gaguuccacu guggauuaca guuuguaugg 2400

acuacuacug uaaauuauag cuuguuugga gggauauuag ucauuauuuu auucaugaca 2460

gguagacuac aauucgaacu uaggguuacc ucagucuuua gccauuacug cuuauuucuu 2520

uuccccaagu cacaaaaaac uuguaagcug cuggguuaaa gcagaggcca ccugucagau 2580

cuacccuacc cuuauuuggu uacauggcac cugagaguuu cacucagacc agggaucuuc 2640

cuuaggaggg ucaaagugca gaucagacca ugcagguaag gugaaccagc ugcacggacc 2700

agguucccgc aaaacauugc cagcuaguga ggcauaauuu gcucaaagua uagaaacagc 2760

ccaccugugc ccacuuugac cauuggugag gauagauaua aaaucacuuc uuccaacgaa 2820

gccuagguga aaaucuauuu auaaauggac cacaacucug gggugucguu uuugugcugu 2880

gacuuccuaa uuauugcuaa agaacuacug uuuaguuggu aaugguguaa aauuacauuc 2940

agcuccuucu ugucauauaa aaggaauuug gagggugucg cuuaaaauuu uauuccaccu 3000

guacauuugu cacuuuaaaa uuaaaauuga gcugguauga gagauaaaaa aaaaaaaaaa 3060

aaaa 3064

<210> 6
<211> 397
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
Met Val Lys Glu Thr Gln Tyr Tyr Asp Ile Leu Gly Val Lys Pro Ser
1               5                  10                  15

Ala Ser Pro Glu Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys
            20                  25                  30

Tyr His Pro Asp Lys Asn Pro Asp Glu Gly Glu Lys Phe Lys Leu Ile
        35                  40                  45

Ser Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Asp Val Tyr
    50                  55                  60

Asp Gln Gly Gly Glu Gln Ala Ile Lys Glu Gly Gly Ser Gly Ser Pro
65                  70                  75                  80

Ser Phe Ser Ser Pro Met Asp Ile Phe Asp Met Phe Phe Gly Gly Gly
                85                  90                  95

Gly Arg Met Ala Arg Glu Arg Arg Gly Lys Asn Val Val His Gln Leu
            100                 105                 110

Ser Val Thr Leu Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Val Thr Lys Lys Leu Ala
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn Val Ile Cys Glu Lys Cys Glu Gly Val Gly Gly Lys
    130                 135                 140

Lys Gly Ser Val Glu Lys Cys Pro Leu Cys Lys Gly Arg Gly Met Gln
145                 150                 155                 160

Ile His Ile Gln Gln Ile Gly Pro Gly Met Val Gln Gln Ile Gln Thr
                165                 170                 175

Val Cys Ile Glu Cys Lys Gly Gln Gly Glu Arg Ile Asn Pro Lys Asp
            180                 185                 190

Arg Cys Glu Ser Cys Ser Gly Ala Lys Val Ile Arg Glu Lys Lys Ile
        195                 200                 205

Ile Glu Val His Val Glu Lys Gly Met Lys Asp Gly Gln Lys Ile Leu
    210                 215                 220
```

```
Phe His Gly Glu Gly Asp Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Gly Asp Val
225                 230                 235                 240

Ile Ile Val Leu Asp Gln Lys Asp His Ser Val Phe Gln Arg Arg Gly
                245                 250                 255

His Asp Leu Ile Met Lys Met Lys Ile Gln Leu Ser Glu Ala Leu Cys
            260                 265                 270

Gly Phe Lys Lys Thr Ile Lys Thr Leu Asp Asn Arg Ile Leu Val Ile
        275                 280                 285

Thr Ser Lys Ala Gly Glu Val Ile Lys His Gly Asp Leu Arg Cys Val
    290                 295                 300

Arg Asp Glu Gly Met Pro Ile Tyr Lys Ala Pro Leu Glu Lys Gly Ile
305                 310                 315                 320

Leu Ile Ile Gln Phe Leu Val Ile Phe Pro Glu Lys His Trp Leu Ser
                325                 330                 335

Leu Glu Lys Leu Pro Gln Leu Glu Ala Leu Leu Pro Pro Arg Gln Lys
            340                 345                 350

Val Arg Ile Thr Asp Asp Met Asp Gln Val Glu Leu Lys Glu Phe Cys
        355                 360                 365

Pro Asn Glu Gln Asn Trp Arg Gln His Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Asp
    370                 375                 380

Glu Asp Gly Pro Gln Ala Gly Val Gln Cys Gln Thr Ala
385                 390                 395
```

<210> 7
<211> 2891
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```
acauuucagc aagcuggcua aagacaugug ggaaagccug acccuggauu caggucaaau      60

cucagcacuc acaagauuua aacucauauc ccaggcauau gaagugcuuu cagauccaaa     120

gaaaagggau guuuaugacc aaggcggaga gcaggcaauu aaagaaggag gcucaggcag     180

ccccagcuuc ucuucaccca uggacaucuu ugacauguuc uuugguggug guggacggau     240

ggcuagagag agaagaggca agaauguugu acaccaguua ucuguaacuc uugaagaucu     300

auauaaugga gucacgaaga aauuggcccu ccagaaaaau guaauuugug agaaauguga     360

agguguuggu gggaagaagg gaucggugga gaagugcccg cugugcaagg ggcgggggau     420
```

gcagauccac auccagcaga ucgggccggg caugguacag cagauccaga ccgugugcau 480

cgagugcaag ggccagggug agcgcaucaa ccccaaggac cgcugcgaga gcugcagcgg 540

ggccaaggug auccgugaga agaagauuau cgagguacau guugaaaaag guaugaaaga 600

ugggcaaaag auacuauuuc auggagaagg agaucaggag ccugagcugg agccugguga 660

ugucauaauu gugcuugauc agaaggauca uagugucuuu cagagacgag gccaugacuu 720

gaucaugaaa augaaaauuc agcuuucuga agcucuuugu ggcuucaaga agacgauaaa 780

aacauuggac aaucgaauuc uuguuauuac auccaaagca ggugagguga uaaagcacgg 840

ggaccugaga ugcgugcgcg augaaggaau gcccaucuac aaagcacccc uggaaaaagg 900

gauucugauc auacaguuuu uaguaaucuu uccugaaaaa cacuggcuuu cucuggaaaa 960

gcuuccucag cuggaagcuu uacucccucc ucgacagaaa gugaggauua cagaugacau 1020

ggaucaggug gagcugaagg aguuuugucc caaugagcag aacuggcguc agcacaggga 1080

ggccuacgag gaggacgaag acgggcccca ggcuggagug cagugccaga cggcaugacg 1140

uggugcgggg cagcguggcc ccaccggacu agcacaugau gaauguaaag uuggcacaau 1200

gaaaaugaca ucgcuuuaau ggccuugugu uugggauguc cuguguaugu guucagcauu 1260

cuuaauugcu gagugucuuu uuggcuuuuc uuuugguugu aacuuaaguu auagcuuaau 1320

uuauauuuaa auguuuuaag uauaaaucac cucuagucug cauauggaau cuguucauuu 1380

cuauuuucag gauauacuuu ugagauguca gugauugcac caauacuuug ugcuucuagu 1440

ggcuuugcca uaauucagug ucaccaauaa ggcacagccc aguuagcagc uuagcccccc 1500

uagcaaaccc caaggcacaa agugggcauc cugacucauc ucuaggucug ugguuucucc 1560

ccucuucccu uggcagaguu auugagggca ugaucucagg gcugcuaaga uaacauuucu 1620

gaggauucua gaugauccuc uuaaagaaua aaagcacauc cguggaucgg acauggcugc 1680

augugccugc uuaacagggc caacuuaguu ccuacuguuc ugugcccuuc aguggaugga 1740

acgugagugu cugaucaucu cucuuggaag uuuucugaac cuuccaagcu cuguggugag 1800

gacaaaccag uguuugaauc auaugcugau aacuguuugc cugugacccu cacaccuugu 1860

ucuucagggu uuuaaugauu uucuguugac aacuuuugca augcuuuccc accaaagugc 1920

uuacuuguaa agaaaacuaa auccuucugu gucccggca gccucagugc agcaacagaa 1980

gccaagggag aaugcugcug guuuggccca uggcacagcc agcuucucug accaguaauc 2040

cggggugacu ugagggucug caaaggcaua gaacucccca guguuuucca ccucauucuc 2100

ccagauugag cucccuucca aaggaucguu ccucucauug cacagccaua uuacaaaggg 2160

uuuccugcuc aagugauguu uugguaagaa cuucgcugag uuccacugug gauuacaguu 2220

uguauggacu acuacuguaa auuauagcuu guuuggaggg auauuaguca uuauuuuauu 2280

caugacaggu agacuacaau ucgaacuuag gguuaccuca gucuuuagcc auuacugcuu 2340

auuucuuuuc cccaagucac aaaaaacuug uaagcugcug gguuaaagca gaggccaccu 2400

gucagaucua cccuacccuu auuugguuac auggcaccug agaguuucac ucagaccagg 2460

gaucuuccuu aggaggguca aagugcagau cagaccaugc agguaaggug aaccagcugc 2520

acggaccagg uucccgcaaa acauugccag cuagugaggc auaauuugcu caaaguauag 2580

aaacagccca ccugugccca cuuugaccau uggugaggau agauauaaaa ucacuucuuc 2640

caacgaagcc uaggugaaaa ucuauuuaua aauggaccac aacucugggg ugucguuuuu 2700

gugcugugac uuccuaauua uugcuaaaga acuacuguuu aguugguaau gguguaaaau 2760

uacauucagc uccuucuugu cauauaaaag gaauuuggag ggugucgcuu aaaauuuuau 2820

uccaccugua cauuugucac uuuaaaauua aaauugagcu gguaugagag auaaaaaaaa 2880

aaaaaaaaaa a 2891

<210> 8
<211> 370
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Trp Glu Ser Leu Thr Leu Asp Ser Gly Gln Ile Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Arg Phe Lys Leu Ile Ser Gln Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro Lys
20 25 30

Lys Arg Asp Val Tyr Asp Gln Gly Gly Glu Gln Ala Ile Lys Glu Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Pro Ser Phe Ser Ser Pro Met Asp Ile Phe Asp Met
50 55 60

Phe Phe Gly Gly Gly Gly Arg Met Ala Arg Glu Arg Arg Gly Lys Asn
65 70 75 80

Val Val His Gln Leu Ser Val Thr Leu Glu Asp Leu Tyr Asn Gly Val
85 90 95

Thr Lys Lys Leu Ala Leu Gln Lys Asn Val Ile Cys Glu Lys Cys Glu
100 105 110

Gly Val Gly Gly Lys Lys Gly Ser Val Glu Lys Cys Pro Leu Cys Lys
115 120 125

Gly Arg Gly Met Gln Ile His Ile Gln Gln Ile Gly Pro Gly Met Val

```
    130                 135                 140

Gln Gln Ile Gln Thr Val Cys Ile Glu Cys Lys Gly Gln Gly Glu Arg
145                 150                 155                 160

Ile Asn Pro Lys Asp Arg Cys Glu Ser Cys Ser Gly Ala Lys Val Ile
                165                 170                 175

Arg Glu Lys Lys Ile Ile Glu Val His Val Glu Lys Gly Met Lys Asp
            180                 185                 190

Gly Gln Lys Ile Leu Phe His Gly Glu Gly Asp Gln Glu Pro Glu Leu
        195                 200                 205

Glu Pro Gly Asp Val Ile Ile Val Leu Asp Gln Lys Asp His Ser Val
    210                 215                 220

Phe Gln Arg Arg Gly His Asp Leu Ile Met Lys Met Lys Ile Gln Leu
225                 230                 235                 240

Ser Glu Ala Leu Cys Gly Phe Lys Lys Thr Ile Lys Thr Leu Asp Asn
                245                 250                 255

Arg Ile Leu Val Ile Thr Ser Lys Ala Gly Glu Val Ile Lys His Gly
            260                 265                 270

Asp Leu Arg Cys Val Arg Asp Glu Gly Met Pro Ile Tyr Lys Ala Pro
        275                 280                 285

Leu Glu Lys Gly Ile Leu Ile Ile Gln Phe Leu Val Ile Phe Pro Glu
    290                 295                 300

Lys His Trp Leu Ser Leu Glu Lys Leu Pro Gln Leu Glu Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320

Pro Pro Arg Gln Lys Val Arg Ile Thr Asp Asp Met Asp Gln Val Glu
                325                 330                 335

Leu Lys Glu Phe Cys Pro Asn Glu Gln Asn Trp Arg Gln His Arg Glu
            340                 345                 350

Ala Tyr Glu Glu Asp Glu Asp Gly Pro Gln Ala Gly Val Gln Cys Gln
        355                 360                 365

Thr Ala
    370
```

<210> 9
<211> 14905
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

cagcggugcg agcuccaggc ccaugcacug aggaggcgga aacaagggga gcccccagag 60

cuccaucaag ccccccuccaa aggcucccccu acccggucca cgcccccccac ccccccuccc 120

cgccuccucc caauugugca uuuuugcagc cggaggcggc uccgagaugg ggcugugagc 180

uucgcccggg gaggggggaaa gagcagcgag gagugaagcg ggggggguggg gugaaggguu 240

uggauuucgg ggcaggggggc gcacccccgu cagcaggccc uccccaaggg gcucggaacu 300

cuaccucuuc acccacgccc cuggugcgcu uugccgaagg aaagaauaag aacagagaag 360

gaggaggggg aaaggaggaa aaggggggacc ccccaacugg ggggggugaa ggagagaagu 420

agcaggacca gaggggaagg ggcugcugcu ugcaucagcc cacaccaugc ugaccccgcc 480

guugcuccug cugcugcccc ugcucucagc ucuggucgcg gcggcuaucg acgccccuaa 540

gacuugcagc cccaagcagu uugccugcag agaucaaaua accuguaucu caaagggcug 600

gcggugcgac ggugagaggg acugcccaga cggaucugac gaggccccug agauuugucc 660

acagaguaag gcccagcgau gccagccaaa cgagcauaac ugccugggua cugagcugug 720

uguucccaug ucccgccucu gcaauggggu ccaggacugc auggacggcu cagaugaggg 780

gccccacugc cgagagcucc aaggcaacug cucucgccug ggcugccagc accauugugu 840

ccccacacuc gaugggccca ccugcuacug caacagcagc uuucagcuuc aggcagaugg 900

caagaccugc aaagauuuug augagugcuc aguguacggc accugcagcc agcuaugcac 960

caacacagac ggcuccuuca uauguggcug uguugaagga uaccuccugc agccggauaa 1020

ccgcuccugc aaggccaaga acgagccagu agaccggccc ccugugcugu ugauagccaa 1080

cucccagaac aucuuggcca cguaccugag uggggcccag gugucuacca ucacaccuac 1140

gagcacgcgg cagaccacag ccauggacuu cagcuaugcc aacgagaccg uaugcugggu 1200

gcauguuggg gacagugcug cucagacgca gcucaagugu gcccgcaugc cuggccuaaa 1260

gggcuucgug gaugagcaca ccaucaacau cucccucagu cugcaccacg uggaacagau 1320

ggccaucgac uggcugacag gcaacuucua cuuuguggau gacaucgaug auaggaucuu 1380

ugucugcaac agaaaugggg acacaugugu cacauugcua gaccuggaac ucuacaaccc 1440

caagggcauu gcccuggacc cugccauggg gaagguguuu uucacugacu augggcagau 1500

cccaaaggug gaacgcugug acauggaugg gcagaaccgc accaagcucg ucgacagcaa 1560

gauuguguuu ccucauggca ucacgcugga ccuggucagc cgccuugucu acugggcaga 1620

ugccuaucug gacuauauug aaguggugga cuaugagggc aagggccgcc agaccaucau 1680

ccagggcauc cugauugagc accuguacgg ccugacugug uuugagaauu aucucuaugc 1740

caccaacucg gacaaugcca augcccagca gaagacgagu gugauccgug ugaaccgcuu 1800

uaacagcacc gaguaccagg uugucacccg gguggacaag gguggugccc uccacaucua 1860

ccaccagagg cgucagcccc gagugaggag ccaugccugu gaaaacgacc aguaugggaa 1920

gccggguggc ugcucugaca ucugccugcu ggccaacagc cacaaggcgc ggaccugccg 1980

cugccguucc ggcuucagcc ugggcaguga cgggaaguca ugcaagaagc cggagcauga 2040

gcuguuccuc guguauggca agggccggcc aggcaucauc cggggcaugg auaugggggc 2100

caaggucccg gaugagcaca ugaucccCau ugaaaaccuc augaaccccc gagcccugga 2160

cuuccacgcu gagaccggcu ucaucuacuu ugccgacacc accagcuacc ucauuggccg 2220

ccagaagauu gauggcacug agcgggagac cauccugaag gacggcaucc acaaugugga 2280

ggguguggcc guggacugga ugggagacaa ucuguacugg acggacgaug ggcccaaaaa 2340

gacaaucagc guggccaggc uggagaaagc ugcucagacc cgcaagacuu uaaucgaggg 2400

caaaaugaca cacccCaggg cuauuguggu ggauccacuc aaugggugga uguacuggac 2460

agacugggag gaggacccca aggacagucg gcgugggcgg cuggagaggg cguggaugga 2520

uggcucacac cgagacaucu uugucaccuc caagacagug cuuuggccca augggcuaag 2580

ccuggacauc ccggcugggc gccucuacug gguggaugcc uucuacgacc gcaucgagac 2640

gauacugcuc aauggcacag accggaagau uguguaugaa gguccugagc ugaaccacgc 2700

cuuuggccug ugucaccaug gcaacuaccu cuucuggacu gaguaucgga guggcagugu 2760

cuaccgcuug gaacggggug uaggaggcgc acccccCacu gugacccuuc ugcgcaguga 2820

gcggcccccc aucuuugaga uccgaaugua ugaugcccag cagcagcaag uuggcaccaa 2880

caaaugccgg gugaacaaug gcggcugcag cagccugugc uuggccaccc cugggagccg 2940

ccagugcgcc ugugcugagg accagguguu ggacgcagac ggcgucacuu gcuuggcgaa 3000

cccauccuac gugccuccac cccagugcca gccaggcgag uuugccugug ccaacagccg 3060

cugcauccag gagcgcugga agugugacgg agacaacgau ugccuggaca acagugauga 3120

ggccccagcc cucugccauc agcacaccug ccccucggac cgauucaagu gcgagaacaa 3180

ccggugcauc cccaaccgcu ggcucugcga cggggacaau gacuguggga acagugaaga 3240

ugaguccaau gccacuuguu cagcccgcac cugcccccCc aaccaguucu ccugugccag 3300

uggccgcugc aucccCaucu ccuggacgug ugaucuggau gacgacugug gggaccgcuc 3360

ugaugagucu gcuucgugug ccuaucccac cugcuucccc cugacucagu uuaccugcaa 3420

caauggcaga uguaucaaca ucaacuggag augcgacaau gacaaugacu guggggacaa 3480

cagugacgaa gccggcugca gccacuccug uucuagcacc caguucaagu gcaacagcgg 3540

gcguugcauc cccgagcacu ggaccugcga uggggacaau gacugcggag acuacaguga 3600

ugagacacac gccaacugca ccaaccaggc cacgaggccc ccugguggcu gccacacuga 3660

ugaguuccag ugccggcugg auggacuaug caucccccug cgguggcgcu gcgaugggga 3720

cacugacugc auggacucca gcgaugagaa gagcugugag ggagugaccc acgucugcga 3780

ucccaguguc aaguuuggcu gcaaggacuc agcucggugc aucagcaaag cgugggugug 3840

ugauggcgac aaugacugug aggauaacuc ggacgaggag aacugcgagu cccuggccug 3900

caggccaccc ucgcacccuu gugccaacaa caccucaguc ugccugcccc cugacaagcu 3960

gugugauggc aacgacgacu guggcgacgg cucagaugag ggcgagcucu gcgaccagug 4020

cucucugaau aacgguggcu gcagccacaa cugcucagug gcaccuggcg aaggcauugu 4080

guguuccugc ccucugggca uggagcuggg gcccgacaac cacaccugcc agauccagag 4140

cuacugugcc aagcaucuca aaugcagcca aaagugcgac cagaacaagu ucagcgugaa 4200

gugcuccugc uacgagggcu ggguccugga accugacggc gagagcugcc gcagccugga 4260

ccccuucaag ccguucauca uuuucuccaa ccgccaugaa auccggcgca ucgaucuuca 4320

caaaggagac uacagcgucc uggugcccgg ccugcgcaac accaucgccc uggacuucca 4380

ccucagccag agcgcccucu acuggaccga cgugguggag gacaagaucu accgcgggaa 4440

gcugcuggac aacggagccc ugacuaguuu cgagguggug auucaguaug gccuggccac 4500

acccgagggc cuggcuguag acuggauugc aggcaacauc uacugggugg agaguaaccu 4560

ggaucagauc gagguggcca agcuggaugg gacccuccgg accacccugc uggccgguga 4620

cauugagcac ccaagggcaa ucgcacugga uccccgggau gggauccugu uuuggacaga 4680

cugggaugcc agccugcccc gcauugaggc agccuccaug aguggggcug ggcgccgcac 4740

cgugcaccgg gagaccggcu cuggggggcug gcccaacggg cucaccgugg acuaccugga 4800

gaagcgcauc cuuuggauug acgccaggguc agaugccauu uacucagccc guuacgacgg 4860

cucuggccac auggaggugc uucggggaca cgaguuccug ucgcacccgu uugcagugac 4920

gcuguacggg ggggaggucu acuggacuga cuggcgaaca aacacacugg cuaaggccaa 4980

caaguggacc ggccacaaug ucaccguggu acagaggacc aacacccagc ccuuugaccu 5040

gcagguguac caccccuccc gccagcccau ggcucccaau cccugugagg ccaaugggggg 5100

ccagggcccc ugcucccacc uguucucau caacuacaac cggaccgugu ccugcgccug 5160

cccccaccuc augaagcucc acaaggacaa caccaccugc uaugaguuua agaaguuccu 5220

gcuguacgca cgucagaugg agauccgagg uguggaccug gaugcucccu acuacaacua 5280

caucaucucc uucacggugc ccgacaucga caacgucaca gugcuagacu acgaugcccg 5340

cgagcagcgu guguacuggu cugacgugcg gacacaggcc aucaagcggg ccuucaucaa 5400

cggcacaggc guggagacag ucgucucugc agacuugcca aaugcccacg ggcuggcugu 5460

ggacuggguc ucccgaaacc uguucuggac aagcuaugac accaauaaga agcagaucaa 5520

uguggcccgg cuggauggcu ccuucaagaa cgcaguggug cagggccugg agcagcccca 5580

uggccuuguc guccacccuc ugcgugggaa gcucuacugg accgauggug acaacaucag 5640

cauggccaac auggauggca gcaaucgcac ccugcucuuc aguggccaga agggccccgu 5700

gggccuggcu auugacuucc cugaaagcaa acucuacugg aucagcuccg ggaaccauac 5760

caucaaccgc ugcaaccugg augggagugg gcuggagguc aucgaugcca ugcggagcca 5820

gcugggcaag gccaccgccc uggccaucau gggggacaag cugugguggg cugaucaggu 5880

gucggaaaag augggcacau gcagcaaggc ugacggcucg ggcuccgugg uccuucggaa 5940

cagcaccacc cuggugaugc acaugaaggu cuaugacgag agcauccagc uggaccauaa 6000

gggcaccaac cccugcagug ucaacaacgg ugacugcucc cagcucugcc ugcccacguc 6060

agagacgacc cgcuccugca ugugcacagc cggcuauagc cuccggagug gccagcaggc 6120

cugcgagggc guagguuccu uucuccugua cucugugcau gagggaauca ggggaauucc 6180

ccuggauccc aaugacaagu cagaugcccu ggucccagug uccgggaccu cgcuggcugu 6240

cggcaucgac uuccacgcug aaaaugacac caucuacugg guggacaugg gccugagcac 6300

gaucagccgg gccaagcggg accagacgug gcgugaagac guggugacca auggcauugg 6360

ccguguggag ggcauugcag uggacuggau cgcaggcaac aucuacugga cagaccaggg 6420

cuuugauguc aucgaggucg cccggcucaa uggcuccuuc cgcuacgugg ugaucuccca 6480

gggucuagac aagccccggg ccaucaccgu ccacccggag aaaggguacu uguucuggac 6540

ugaguggggu caguauccgc guauugagcg gucucggcua gauggcacgg agcguguggu 6600

gcuggucaac gucagcauca gcuggcccaa cggcaucuca guggacuacc aggaugggaa 6660

gcuguacugg ugcgaugcac ggacagacaa gauugaacgg aucgaccugg agacagguga 6720

gaaccgcgag gugguucugu ccagcaacaa cauggacaug uuuucagugu cuguguuuga 6780

ggauuucauc uacuggagug acaggacuca ugccaacggc ucuaucaagc gcgggagcaa 6840

agacaaugcc acagacuccg ugccccugcg aaccggcauc ggcguccagc uuaaagacau 6900

caaagucuuc aaccgggacc ggcagaaagg caccaacgug ugcgcggugg ccaauggcgg 6960

gugccagcag cugugccugu accggggccg uggggcagcgg gccugcgccu gugcccacgg 7020

gaugcuggcu gaagacggag caucgugccg cgaguaugcc ggcuaccugc ucuacucaga 7080

gcgcaccauu cucaagagua uccaccuguc ggaugagcgc aaccucaaug cgcccgugca 7140

gcccuucgag gacccugagc acaugaagaa cgucaucgcc cuggccuuug acuaccgggc 7200

aggcaccucu ccgggcaccc ccaaucgcau cuucuucagc gacauccacu uugggaacau 7260

ccaacagauc aacgacgaug gcuccaggag gaucaccauu guggaaaacg ugggcuccgu 7320

ggaaggccug gccuaucacc guggcuggga cacucucuau uggacaagcu acacgacauc 7380

caccaucacg cgccacacag uggaccagac ccgcccaggg gccuucgagc gugagaccgu 7440

caucacuaug ucuggagaug accacccacg ggccuucguu uuggacgagu gccagaaccu 7500

cauguucugg accaacugga augagcagca ucccagcauc augcgggcgg cgcucucggg 7560

agccaauguc cugacccuua ucgagaagga cauccguacc cccaauggcc uggccaucga 7620

ccaccgugcc gagaagcucu acuucucuga cgccacccug gacaagaucg agcggugcga 7680

guaugacggc ucccaccgcu augugauccu aaagucagag ccuguccacc ccuucgggcu 7740

ggccguguau ggggagcaca uuuucuggac ugacugggug cggcgggcag ugcagcgggc 7800

caacaagcac gugggcagca acaugaagcu gcugcgcgug gacaucccc agcagcccau 7860

gggcaucauc gccguggcca acgacaccaa cagcugugaa cucucuccau gccgaaucaa 7920

caacgguggc ugccaggacc ugugucugcu cacucaccag ggccauguca acugcucaug 7980

ccgaggggc cgaauccucc aggaugaccu caccugccga gcggugaauu ccucuugccg 8040

agcacaagau gaguuugagu gugccaaugg cgagugcauc aacuucagcc ugaccugcga 8100

cggcgucccc cacugcaagg acaaguccga ugagaagcca uccuacugca acucccgccg 8160

cugcaagaag acuuuccggc agugcagcaa ugggcgcugu guguccaaca ugcuguggug 8220

caacggggcc gacgacugug gggauggcuc ugacgagauc ccuugcaaca agacagccug 8280

uggugugggc gaguuccgcu gccgggacgg gaccugcauc gggaacucca gccgcugcaa 8340

ccaguuugug gauugugagg acgccucaga ugagaugaac ugcagugcca ccgacugcag 8400

cagcuacuuc cgccugggcg ugaagggcgu gcucuuccag cccugcgagc ggaccucacu 8460

cugcuacgca cccagcuggg ugugugaugg cgccaaugac uguggggacu acagugauga 8520

gcgcgacugc ccagguguga aacgccccag augcccucug aauuacuucg ccugcccuag 8580

ugggcgcugc aucccccauga gcuggacgug ugacaaagag gaugacugug aacauggcga 8640

ggacgagacc cacugcaaca aguucugcuc agaggcccag uuugagugcc agaaccaucg 8700

cugcaucucc aagcaguggc ugugugacgg cagcgaugac uguggggaug gcucagacga 8760

ggcugcucac ugugaaggca agacgugcgg ccccuccucc uucuccugcc cuggcaccca 8820

cgugugcguc cccgagcgcu ggcucuguga cggugacaaa gacugugcug auggugcaga 8880

cgagagcauc gcagcugguu gcuuguacaa cagcacuugu gacgaccgug aguucaugug 8940

ccagaaccgc cagugcaucc ccaagcacuu cgugugugac cacgaccgug acugugcaga 9000

uggcucugau gaguccccg agugugagua cccgaccugc ggccccagug aguuccgcug 9060

ugccaauggg cgcugucuga gcucccgcca gugggagugu gauggcgaga augacugcca 9120

cgaccagagu gacgaggcuc ccaagaaccc acacugcacc agccaagagc acaagugcaa 9180

ugccucguca caguuccugu gcagcagugg gcgcugugug gcugaggcac ugcucugcaa 9240

cggccaggau gacuguggcg acagcucgga cgagcguggc ugccacauca augagugucu 9300

cagccgcaag cucaguggcu gcagccagga cugugaggac cucaagaucg gcuucaagug 9360

ccgcugucgc ccuggcuucc ggcugaagga cgacggccgg acgugugcug auguggacga 9420

gugcagcacc accuuccccu gcagccagcg cugcaucaac acucauggca gcuauaagug 9480

ucugugugug gagggcuaug caccccgcgg cggcgacccc cacagcugca aggcugugac 9540

ugacgaggaa ccguuucuga ucuucgccaa ccgguacuac cugcgcaagc ucaaccugga 9600

cggguccaac uacacguuac uuaagcaggg ccugaacaac gccguugccu uggauuuuga 9660

cuaccgagag cagaugaucu acuggacaga ugugaccacc cagggcagca ugauccgaag 9720

gaugcaccuu aacgggagca augugcaggu ccuacaccgu acaggccuca gcaaccccga 9780

ugggcuggcu guggacuggg uggguggcaa ccuguacugg ugcgacaaag gccgggacac 9840

caucgaggug uccaagcuca auggggccua ucggacggug cuggucagcu cuggccuccg 9900

ugagcccagg gcucuggugg uggaugugca gaauggguac cuguacugga cagacugggg 9960

ugaccauuca cugaucggcc gcaucggcau ggaugggucc agccgcagcg ucaucgugga 10020

caccaagauc acauggccca auggccugac gcuggacuau gucacugagc gcaucuacug 10080

ggccgacgcc cgcgaggacu acauugaauu ugccagccug gauggcucca aucgccacgu 10140

ugugcugagc caggacaucc cgcacaucuu ugcacugacc cuguuugagg acuacgucua 10200

cuggaccgac ugggaaacaa aguccauuaa ccgagcccac aagaccacgg gcaccaacaa 10260

aacgcuccuc aucagcacgc ugcaccggcc cauggaccug caugucuucc augcccugcg 10320

ccagccagac gugcccaauc accccugcaa ggucaacaau gguggcugca gcaaccugug 10380

ccugcugucc cccgggggag ggcacaaaug ugccugcccc accaacuucu accugggcag 10440

cgaugggcgc accugugugu ccaacugcac ggcuagccag uuuguaugca agaacgacaa 10500

gugcaucccc uucuggugga agugugacac cgaggacgac ugcggggacc acucagacga 10560

gcccccggac ugcccugagu ucaagugccg gcccggacag uuccagugcu ccacagguau 10620

cugcacaaac ccugccuuca ucugcgaugg cgacaaugac ugccaggaca acagugacga 10680

ggccaacugu gacauccacg ucugcuugcc cagucaguuc aaaugcacca acaccaaccg 10740

cuguauuccc ggcaucuucc gcugcaaugg gcaggacaac ugcggagaug gggaggauga 10800

gagggacugc cccgagguga ccugcgcccc caaccaguuc cagugcucca uuaccaaacg 10860

gugcaucccc cgggucuggg ucugcgaccg ggacaaugac uguguggaug gcagugauga 10920

gcccgccaac ugcacccaga ugaccugugg uguggacgag uuccgcugca aggauucggg 10980

ccgcugcauc ccagcgcguu ggaaguguga cggagaggau gacugugggg auggcucgga 11040

ugagcccaag gaagagugug augaacgcac cugugagcca uaccaguucc gcugcaagaa 11100

caaccgcugc gugcccggcc gcuggcagug cgacuacgac aacgauugcg gugacaacuc 11160

cgaugaagag agcugcaccc cucggcccug cuccgagagu gaguucuccu gugccaacgg 11220

ccgcugcauc gcggggcgcu ggaaaugcga uggagaccac gacugcgcgg acggcucgga 11280

cgagaaagac ugcacccccc gcugugacau ggaccaguuc cagugcaaga gcggccacug 11340

caucccccug cgcuggcgcu gugacgcaga cgccgacugc auggacggca gcgacgagga 11400

ggccugcggc acuggcgugc ggaccugccc ccuggacgag uuccagugca acaacaccuu 11460

gugcaagccg cuggccugga agugcgaugg cgaggaugac uguggggaca acucagauga 11520

gaaccccgag gagugugccc gguucgugug cccucccaac cggcccuucc guugcaagaa 11580

ugaccgcguc ugucugugga ucgggcgcca augcgauggc acggacaacu guggggaugg 11640

gacugaugaa gaggacugug agccccccac agcccacacc acccacugca aagacaagaa 11700

ggaguuucug ugccggaacc agcgcugccu cuccuccucc cugcgcugca acauguucga 11760

ugacugcggg gacggcucug acgaggagga cugcagcauc gaccccaagc ugaccagcug 11820

cgccaccaau gccagcaucu gugggacga ggcacgcugc gugcgcaccg agaaagcggc 11880

cuacugugcc ugccgcucgg gcuuccacac cgugcccggc cagcccggau gccaagacau 11940

caacgagugc cugcgcuucg gcaccugcuc ccagcucugc aacaacacca agggcggcca 12000

ccucugcagc ugcgcucgga acuucaugaa gacgcacaac accugcaagg ccgaaggcuc 12060

ugaguaccag guccuguaca ucgcugauga caaugagauc cgcagccugu uccccggcca 12120

cccccauucg gcuuacgagc aggcauucca gggugacgag aguguccgca uugaugcuau 12180

ggauguccau gucaaggcug gccgugucua uuggaccaac uggcacacgg gcaccaucuc 12240

cuaccgcagc cugccaccug cugcgccucc uaccacuucc aaccgccacc ggcgacagau 12300

ugaccggggu gucacccacc ucaacauuuc agggcugaag augcccagag gcaucgccau 12360

cgacugggug gccggaaacg uguacuggac cgacucgggc cgagauguga uugagguggc 12420

gcagaugaag ggcgagaacc gcaagacgcu caucucgggc augauugacg agccccacgc 12480

cauuguggug gacccacuga gggggaccau guacugguca gacuggggca accaccccaa 12540

gauugagacg gcagcgaugg augggacgcu ucgggagaca cuggugcagg acaacauuca 12600

guggcccaca ggccuggccg uggauuauca caaugagcgg cuguacuggg cagacgccaa 12660

gcuuucaguc aucggcagca uccggcucaa uggcacggac cccauugugg cugcugacag 12720

caaacgaggc cuaagucacc ccuucagcau cgacgucuuu gaggauuaca ucuauggugu 12780

caccuacauc aauaaucgug ucuucaagau ccauaaguuu ggccacagcc ccuuggucaa 12840

ccugacaggg ggccugagcc acgccucuga cgugguccuu uaccaucagc acaagcagcc 12900

cgaagugacc aacccaugug accgcaagaa augcgagugg cucugccugc ugagccccag 12960

ugggccuguc ugcaccuguc ccaaugggaa gcggcuggac aacggcacau gcgugccugu 13020

gcccucucca acgccccccc cagaugcucc ccggccugga accuguaacc ugcagugcuu 13080

caacgguggc agcuguuucc ucaaugcacg gaggcagccc aagugccgcu gccaaccccg 13140

cuacacgggu gacaagugug aacuggacca gugcugggag cacugucgca auggggcac 13200

cugugcugcc ucccccucug gcaugcccac gugccggugc cccacgggcu ucacgggccc 13260

caaaugcacc cagcaggugu gugcgggcua cugugccaac aacagcaccu gcacugucaa 13320

ccagggcaac cagccccagu gccgaugccu acccggcuuc cugggcgacc gcugccagua 13380

ccggcagugc ucuggcuacu gugagaacuu uggcacaugc cagauggcug cugauggcuc 13440

ccgacaaugc cgcugcacug ccuacuuuga gggaucgagg ugugagguga acaagugcag 13500

ccgcugucuc gaaggggccu guguggucaa caagcagagu ggggauguca ccugcaacug 13560

cacggauggc cggguggccc ccagcugucu gaccugcguc ggccacugca gcaauggcgg 13620

cuccuguacc augaacagca aaaugaugcc ugagugccag ugcccacccc acaugacagg 13680

gccccggugu gaggagcacg ucuucagcca gcagcagcca ggacauauag ccuccauccu 13740

aaucccucug cuguugcugc ugcugcuggu ucugguggcc ggaguggguau ucugguauaa 13800

gcggcgaguc caaggggcua agggcuucca gcaccaacgg augaccaacg gggccaugaa 13860

cguggagauu ggaaacccca ccuacaagau guacgaaggc ggagagccug augauguggg 13920

aggccuacug gacgcugacu uugcccugga cccugacaag cccaccaacu ucaccaaccc 13980

cguguaugcc acacucuaca ugggggggcca uggcagucgc cacucccugg ccagcacgga 14040

cgagaagcga gaacuccugg gccggggccc ugaggacgag auaggggacc ccuuggcaua 14100

gggcccugcc ccgucggacu gcccccagaa agccuccugc ccccugccgg ugaaguccuu 14160

cagugagccc cucccccagcc agcccuuccc uggccccgcc ggauguauaa auguaaaaau 14220

gaaggaauua cauuuuauau gugagcgagc aagccggcaa gcgagcacag uauuauuucu 14280

ccaucccccuc ccugccugcu ccuuggcacc cccaugcugc cuucagggag acaggcaggg 14340

agggcuuggg gcugcaccuc cuacccuccc accagaacgc accccacugg gagagcuggu 14400

ggugcagccu uccccucccu guauaagaca cuuugccaag gcucucccccu cucgccccau 14460

cccugcuugc ccgcucccac agcuuccuga gggcuaauuc ugggaaggga gaguucuuug 14520

cugccccugu cuggaagacg uggcucuggg ugagguaggc gggaaaggau ggaguguuuu 14580

aguucuuggg ggaggccacc ccaaacccca gccccaacuc caggggcacc uaugagaugg 14640

ccaugcucaa ccccccuccc agacaggccc ucccugucuc cagggccccc accgagguuc 14700

ccagggcugg agacuuccuc ugguaaacau uccuccagcc ucccccuccc uggggacgcc 14760

aaggaggugg gccacaccca ggaagggaaa gcgggcagcc ccguuuuggg gacgugaacg 14820

uuuuaauaau uuuugcugaa uuccuuuaca acuaaauaac acagauauug uuauaaauaa 14880

aauuguaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 14905

<210> 10
<211> 4544
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```
Met Leu Thr Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Leu
1               5                  10                  15

Val Ala Ala Ala Ile Asp Ala Pro Lys Thr Cys Ser Pro Lys Gln Phe
            20                  25                  30

Ala Cys Arg Asp Gln Ile Thr Cys Ile Ser Lys Gly Trp Arg Cys Asp
        35                  40                  45

Gly Glu Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Pro Glu Ile Cys
    50                  55                  60

Pro Gln Ser Lys Ala Gln Arg Cys Gln Pro Asn Glu His Asn Cys Leu
65                  70                  75                  80

Gly Thr Glu Leu Cys Val Pro Met Ser Arg Leu Cys Asn Gly Val Gln
                85                  90                  95

Asp Cys Met Asp Gly Ser Asp Glu Gly Pro His Cys Arg Glu Leu Gln
            100                 105                 110

Gly Asn Cys Ser Arg Leu Gly Cys Gln His His Cys Val Pro Thr Leu
        115                 120                 125

Asp Gly Pro Thr Cys Tyr Cys Asn Ser Ser Phe Gln Leu Gln Ala Asp
    130                 135                 140

Gly Lys Thr Cys Lys Asp Phe Asp Glu Cys Ser Val Tyr Gly Thr Cys
145                 150                 155                 160

Ser Gln Leu Cys Thr Asn Thr Asp Gly Ser Phe Ile Cys Gly Cys Val
                165                 170                 175

Glu Gly Tyr Leu Leu Gln Pro Asp Asn Arg Ser Cys Lys Ala Lys Asn
            180                 185                 190

Glu Pro Val Asp Arg Pro Pro Val Leu Leu Ile Ala Asn Ser Gln Asn
        195                 200                 205

Ile Leu Ala Thr Tyr Leu Ser Gly Ala Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro
    210                 215                 220
```

```
Thr Ser Thr Arg Gln Thr Thr Ala Met Asp Phe Ser Tyr Ala Asn Glu
225                 230                 235                 240

Thr Val Cys Trp Val His Val Gly Asp Ser Ala Ala Gln Thr Gln Leu
                245                 250                 255

Lys Cys Ala Arg Met Pro Gly Leu Lys Gly Phe Val Asp Glu His Thr
            260                 265                 270

Ile Asn Ile Ser Leu Ser Leu His His Val Glu Gln Met Ala Ile Asp
        275                 280                 285

Trp Leu Thr Gly Asn Phe Tyr Phe Val Asp Asp Ile Asp Asp Arg Ile
    290                 295                 300

Phe Val Cys Asn Arg Asn Gly Asp Thr Cys Val Thr Leu Leu Asp Leu
305                 310                 315                 320

Glu Leu Tyr Asn Pro Lys Gly Ile Ala Leu Asp Pro Ala Met Gly Lys
                325                 330                 335

Val Phe Phe Thr Asp Tyr Gly Gln Ile Pro Lys Val Glu Arg Cys Asp
            340                 345                 350

Met Asp Gly Gln Asn Arg Thr Lys Leu Val Asp Ser Lys Ile Val Phe
        355                 360                 365

Pro His Gly Ile Thr Leu Asp Leu Val Ser Arg Leu Val Tyr Trp Ala
    370                 375                 380

Asp Ala Tyr Leu Asp Tyr Ile Glu Val Val Asp Tyr Glu Gly Lys Gly
385                 390                 395                 400

Arg Gln Thr Ile Ile Gln Gly Ile Leu Ile Glu His Leu Tyr Gly Leu
                405                 410                 415

Thr Val Phe Glu Asn Tyr Leu Tyr Ala Thr Asn Ser Asp Asn Ala Asn
            420                 425                 430

Ala Gln Gln Lys Thr Ser Val Ile Arg Val Asn Arg Phe Asn Ser Thr
        435                 440                 445

Glu Tyr Gln Val Val Thr Arg Val Asp Lys Gly Gly Ala Leu His Ile
    450                 455                 460

Tyr His Gln Arg Arg Gln Pro Arg Val Arg Ser His Ala Cys Glu Asn
465                 470                 475                 480
```

```
Asp Gln Tyr Gly Lys Pro Gly Gly Cys Ser Asp Ile Cys Leu Leu Ala
                485                 490                 495

Asn Ser His Lys Ala Arg Thr Cys Arg Cys Arg Ser Gly Phe Ser Leu
            500                 505                 510

Gly Ser Asp Gly Lys Ser Cys Lys Lys Pro Glu His Glu Leu Phe Leu
        515                 520                 525

Val Tyr Gly Lys Gly Arg Pro Gly Ile Ile Arg Gly Met Asp Met Gly
    530                 535                 540

Ala Lys Val Pro Asp Glu His Met Ile Pro Ile Glu Asn Leu Met Asn
545                 550                 555                 560

Pro Arg Ala Leu Asp Phe His Ala Glu Thr Gly Phe Ile Tyr Phe Ala
                565                 570                 575

Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ile Gly Arg Gln Lys Ile Asp Gly Thr Glu
            580                 585                 590

Arg Glu Thr Ile Leu Lys Asp Gly Ile His Asn Val Glu Gly Val Ala
        595                 600                 605

Val Asp Trp Met Gly Asp Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Asp Gly Pro Lys
    610                 615                 620

Lys Thr Ile Ser Val Ala Arg Leu Glu Lys Ala Ala Gln Thr Arg Lys
625                 630                 635                 640

Thr Leu Ile Glu Gly Lys Met Thr His Pro Arg Ala Ile Val Val Asp
                645                 650                 655

Pro Leu Asn Gly Trp Met Tyr Trp Thr Asp Trp Glu Glu Asp Pro Lys
            660                 665                 670

Asp Ser Arg Arg Gly Arg Leu Glu Arg Ala Trp Met Asp Gly Ser His
        675                 680                 685

Arg Asp Ile Phe Val Thr Ser Lys Thr Val Leu Trp Pro Asn Gly Leu
    690                 695                 700

Ser Leu Asp Ile Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ala Phe Tyr
705                 710                 715                 720

Asp Arg Ile Glu Thr Ile Leu Leu Asn Gly Thr Asp Arg Lys Ile Val
```

```
                725                 730                 735

Tyr Glu Gly Pro Glu Leu Asn His Ala Phe Gly Leu Cys His His Gly
            740                 745                 750

Asn Tyr Leu Phe Trp Thr Glu Tyr Arg Ser Gly Ser Val Tyr Arg Leu
        755                 760                 765

Glu Arg Gly Val Gly Gly Ala Pro Pro Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser
    770                 775                 780

Glu Arg Pro Pro Ile Phe Glu Ile Arg Met Tyr Asp Ala Gln Gln Gln
785                 790                 795                 800

Gln Val Gly Thr Asn Lys Cys Arg Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser Ser
                805                 810                 815

Leu Cys Leu Ala Thr Pro Gly Ser Arg Gln Cys Ala Cys Ala Glu Asp
            820                 825                 830

Gln Val Leu Asp Ala Asp Gly Val Thr Cys Leu Ala Asn Pro Ser Tyr
        835                 840                 845

Val Pro Pro Pro Gln Cys Gln Pro Gly Glu Phe Ala Cys Ala Asn Ser
    850                 855                 860

Arg Cys Ile Gln Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Leu
865                 870                 875                 880

Asp Asn Ser Asp Glu Ala Pro Ala Leu Cys His Gln His Thr Cys Pro
                885                 890                 895

Ser Asp Arg Phe Lys Cys Glu Asn Asn Arg Cys Ile Pro Asn Arg Trp
            900                 905                 910

Leu Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asn Ser Glu Asp Glu Ser Asn
        915                 920                 925

Ala Thr Cys Ser Ala Arg Thr Cys Pro Pro Asn Gln Phe Ser Cys Ala
    930                 935                 940

Ser Gly Arg Cys Ile Pro Ile Ser Trp Thr Cys Asp Leu Asp Asp Asp
945                 950                 955                 960

Cys Gly Asp Arg Ser Asp Glu Ser Ala Ser Cys Ala Tyr Pro Thr Cys
                965                 970                 975
```

```
Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile Asn Ile
            980                 985                 990

Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn  Asp Cys Gly Asp Asn  Ser Asp Glu
        995                 1000                1005

Ala Gly  Cys Ser His Ser Cys  Ser Ser Thr Gln Phe  Lys Cys Asn
    1010                1015                1020

Ser Gly  Arg Cys Ile Pro Glu  His Trp Thr Cys Asp  Gly Asp Asn
    1025                1030                1035

Asp Cys  Gly Asp Tyr Ser Asp  Glu Thr His Ala Asn  Cys Thr Asn
    1040                1045                1050

Gln Ala  Thr Arg Pro Pro Gly  Gly Cys His Thr Asp  Glu Phe Gln
    1055                1060                1065

Cys Arg  Leu Asp Gly Leu Cys  Ile Pro Leu Arg Trp  Arg Cys Asp
    1070                1075                1080

Gly Asp  Thr Asp Cys Met Asp  Ser Ser Asp Glu Lys  Ser Cys Glu
    1085                1090                1095

Gly Val  Thr His Val Cys Asp  Pro Ser Val Lys Phe  Gly Cys Lys
    1100                1105                1110

Asp Ser  Ala Arg Cys Ile Ser  Lys Ala Trp Val Cys  Asp Gly Asp
    1115                1120                1125

Asn Asp  Cys Glu Asp Asn Ser  Asp Glu Glu Asn Cys  Glu Ser Leu
    1130                1135                1140

Ala Cys  Arg Pro Pro Ser His  Pro Cys Ala Asn Asn  Thr Ser Val
    1145                1150                1155

Cys Leu  Pro Pro Asp Lys Leu  Cys Asp Gly Asn Asp  Asp Cys Gly
    1160                1165                1170

Asp Gly  Ser Asp Glu Gly Glu  Leu Cys Asp Gln Cys  Ser Leu Asn
    1175                1180                1185

Asn Gly  Gly Cys Ser His Asn  Cys Ser Val Ala Pro  Gly Glu Gly
    1190                1195                1200

Ile Val  Cys Ser Cys Pro Leu  Gly Met Glu Leu Gly  Pro Asp Asn
    1205                1210                1215
```

```
His Thr  Cys Gln Ile Gln Ser  Tyr Cys Ala Lys His  Leu Lys Cys
    1220                 1225                 1230

Ser Gln  Lys Cys Asp Gln Asn  Lys Phe Ser Val Lys  Cys Ser Cys
    1235                 1240                 1245

Tyr Glu  Gly Trp Val Leu Glu  Pro Asp Gly Glu Ser  Cys Arg Ser
    1250                 1255                 1260

Leu Asp  Pro Phe Lys Pro Phe  Ile Ile Phe Ser Asn  Arg His Glu
    1265                 1270                 1275

Ile Arg  Arg Ile Asp Leu His  Lys Gly Asp Tyr Ser  Val Leu Val
    1280                 1285                 1290

Pro Gly  Leu Arg Asn Thr Ile  Ala Leu Asp Phe His  Leu Ser Gln
    1295                 1300                 1305

Ser Ala  Leu Tyr Trp Thr Asp  Val Val Glu Asp Lys  Ile Tyr Arg
    1310                 1315                 1320

Gly Lys  Leu Leu Asp Asn Gly  Ala Leu Thr Ser Phe  Glu Val Val
    1325                 1330                 1335

Ile Gln  Tyr Gly Leu Ala Thr  Pro Glu Gly Leu Ala  Val Asp Trp
    1340                 1345                 1350

Ile Ala  Gly Asn Ile Tyr Trp  Val Glu Ser Asn Leu  Asp Gln Ile
    1355                 1360                 1365

Glu Val  Ala Lys Leu Asp Gly  Thr Leu Arg Thr Thr  Leu Leu Ala
    1370                 1375                 1380

Gly Asp  Ile Glu His Pro Arg  Ala Ile Ala Leu Asp  Pro Arg Asp
    1385                 1390                 1395

Gly Ile  Leu Phe Trp Thr Asp  Trp Asp Ala Ser Leu  Pro Arg Ile
    1400                 1405                 1410

Glu Ala  Ala Ser Met Ser Gly  Ala Gly Arg Arg Thr  Val His Arg
    1415                 1420                 1425

Glu Thr  Gly Ser Gly Gly Trp  Pro Asn Gly Leu Thr  Val Asp Tyr
    1430                 1435                 1440

Leu Glu  Lys Arg Ile Leu Trp  Ile Asp Ala Arg Ser  Asp Ala Ile
    1445                 1450                 1455
```

```
Tyr Ser  Ala Arg Tyr Asp Gly  Ser Gly His Met Glu  Val Leu Arg
    1460                 1465                 1470

Gly His  Glu Phe Leu Ser His  Pro Phe Ala Val Thr  Leu Tyr Gly
    1475                 1480                 1485

Gly Glu  Val Tyr Trp Thr Asp  Trp Arg Thr Asn Thr  Leu Ala Lys
    1490                 1495                 1500

Ala Asn  Lys Trp Thr Gly His  Asn Val Thr Val Val  Gln Arg Thr
    1505                 1510                 1515

Asn Thr  Gln Pro Phe Asp Leu  Gln Val Tyr His Pro  Ser Arg Gln
    1520                 1525                 1530

Pro Met  Ala Pro Asn Pro Cys  Glu Ala Asn Gly Gly  Gln Gly Pro
    1535                 1540                 1545

Cys Ser  His Leu Cys Leu Ile  Asn Tyr Asn Arg Thr  Val Ser Cys
    1550                 1555                 1560

Ala Cys  Pro His Leu Met Lys  Leu His Lys Asp Asn  Thr Thr Cys
    1565                 1570                 1575

Tyr Glu  Phe Lys Lys Phe Leu  Leu Tyr Ala Arg Gln  Met Glu Ile
    1580                 1585                 1590

Arg Gly  Val Asp Leu Asp Ala  Pro Tyr Tyr Asn Tyr  Ile Ile Ser
    1595                 1600                 1605

Phe Thr  Val Pro Asp Ile Asp  Asn Val Thr Val Leu  Asp Tyr Asp
    1610                 1615                 1620

Ala Arg  Glu Gln Arg Val Tyr  Trp Ser Asp Val Arg  Thr Gln Ala
    1625                 1630                 1635

Ile Lys  Arg Ala Phe Ile Asn  Gly Thr Gly Val Glu  Thr Val Val
    1640                 1645                 1650

Ser Ala  Asp Leu Pro Asn Ala  His Gly Leu Ala Val  Asp Trp Val
    1655                 1660                 1665

Ser Arg  Asn Leu Phe Trp Thr  Ser Tyr Asp Thr Asn  Lys Lys Gln
    1670                 1675                 1680

Ile Asn  Val Ala Arg Leu Asp  Gly Ser Phe Lys Asn  Ala Val Val
```

```
    1685                1690                1695

Gln Gly  Leu Glu Gln Pro His  Gly Leu Val Val His  Pro Leu Arg
    1700                1705                1710

Gly Lys  Leu Tyr Trp Thr Asp  Gly Asp Asn Ile Ser  Met Ala Asn
    1715                1720                1725

Met Asp  Gly Ser Asn Arg Thr  Leu Leu Phe Ser Gly  Gln Lys Gly
    1730                1735                1740

Pro Val  Gly Leu Ala Ile Asp  Phe Pro Glu Ser Lys  Leu Tyr Trp
    1745                1750                1755

Ile Ser  Ser Gly Asn His Thr  Ile Asn Arg Cys Asn  Leu Asp Gly
    1760                1765                1770

Ser Gly  Leu Glu Val Ile Asp  Ala Met Arg Ser Gln  Leu Gly Lys
    1775                1780                1785

Ala Thr  Ala Leu Ala Ile Met  Gly Asp Lys Leu Trp  Trp Ala Asp
    1790                1795                1800

Gln Val  Ser Glu Lys Met Gly  Thr Cys Ser Lys Ala  Asp Gly Ser
    1805                1810                1815

Gly Ser  Val Val Leu Arg Asn  Ser Thr Thr Leu Val  Met His Met
    1820                1825                1830

Lys Val  Tyr Asp Glu Ser Ile  Gln Leu Asp His Lys  Gly Thr Asn
    1835                1840                1845

Pro Cys  Ser Val Asn Asn Gly  Asp Cys Ser Gln Leu  Cys Leu Pro
    1850                1855                1860

Thr Ser  Glu Thr Thr Arg Ser  Cys Met Cys Thr Ala  Gly Tyr Ser
    1865                1870                1875

Leu Arg  Ser Gly Gln Gln Ala  Cys Glu Gly Val Gly  Ser Phe Leu
    1880                1885                1890

Leu Tyr  Ser Val His Glu Gly  Ile Arg Gly Ile Pro  Leu Asp Pro
    1895                1900                1905

Asn Asp  Lys Ser Asp Ala Leu  Val Pro Val Ser Gly  Thr Ser Leu
    1910                1915                1920
```

```
Ala Val  Gly Ile Asp Phe His  Ala Glu Asn Asp Thr  Ile Tyr Trp
    1925                1930                1935

Val Asp  Met Gly Leu Ser Thr  Ile Ser Arg Ala Lys  Arg Asp Gln
    1940                1945                1950

Thr Trp  Arg Glu Asp Val Val  Thr Asn Gly Ile Gly  Arg Val Glu
    1955                1960                1965

Gly Ile  Ala Val Asp Trp Ile  Ala Gly Asn Ile Tyr  Trp Thr Asp
    1970                1975                1980

Gln Gly  Phe Asp Val Ile Glu  Val Ala Arg Leu Asn  Gly Ser Phe
    1985                1990                1995

Arg Tyr  Val Val Ile Ser Gln  Gly Leu Asp Lys Pro  Arg Ala Ile
    2000                2005                2010

Thr Val  His Pro Glu Lys Gly  Tyr Leu Phe Trp Thr  Glu Trp Gly
    2015                2020                2025

Gln Tyr  Pro Arg Ile Glu Arg  Ser Arg Leu Asp Gly  Thr Glu Arg
    2030                2035                2040

Val Val  Leu Val Asn Val Ser  Ile Ser Trp Pro Asn  Gly Ile Ser
    2045                2050                2055

Val Asp  Tyr Gln Asp Gly Lys  Leu Tyr Trp Cys Asp  Ala Arg Thr
    2060                2065                2070

Asp Lys  Ile Glu Arg Ile Asp  Leu Glu Thr Gly Glu  Asn Arg Glu
    2075                2080                2085

Val Val  Leu Ser Ser Asn Asn  Met Asp Met Phe Ser  Val Ser Val
    2090                2095                2100

Phe Glu  Asp Phe Ile Tyr Trp  Ser Asp Arg Thr His  Ala Asn Gly
    2105                2110                2115

Ser Ile  Lys Arg Gly Ser Lys  Asp Asn Ala Thr Asp  Ser Val Pro
    2120                2125                2130

Leu Arg  Thr Gly Ile Gly Val  Gln Leu Lys Asp Ile  Lys Val Phe
    2135                2140                2145

Asn Arg  Asp Arg Gln Lys Gly  Thr Asn Val Cys Ala  Val Ala Asn
    2150                2155                2160
```

```
Gly Gly  Cys Gln Gln Leu Cys  Leu Tyr Arg Gly Arg  Gly Gln Arg
    2165                 2170                 2175

Ala Cys  Ala Cys Ala His Gly  Met Leu Ala Glu Asp  Gly Ala Ser
    2180                 2185                 2190

Cys Arg  Glu Tyr Ala Gly Tyr  Leu Leu Tyr Ser Glu  Arg Thr Ile
    2195                 2200                 2205

Leu Lys  Ser Ile His Leu Ser  Asp Glu Arg Asn Leu  Asn Ala Pro
    2210                 2215                 2220

Val Gln  Pro Phe Glu Asp Pro  Glu His Met Lys Asn  Val Ile Ala
    2225                 2230                 2235

Leu Ala  Phe Asp Tyr Arg Ala  Gly Thr Ser Pro Gly  Thr Pro Asn
    2240                 2245                 2250

Arg Ile  Phe Phe Ser Asp Ile  His Phe Gly Asn Ile  Gln Gln Ile
    2255                 2260                 2265

Asn Asp  Asp Gly Ser Arg Arg  Ile Thr Ile Val Glu  Asn Val Gly
    2270                 2275                 2280

Ser Val  Glu Gly Leu Ala Tyr  His Arg Gly Trp Asp  Thr Leu Tyr
    2285                 2290                 2295

Trp Thr  Ser Tyr Thr Thr Ser  Thr Ile Thr Arg His  Thr Val Asp
    2300                 2305                 2310

Gln Thr  Arg Pro Gly Ala Phe  Glu Arg Glu Thr Val  Ile Thr Met
    2315                 2320                 2325

Ser Gly  Asp Asp His Pro Arg  Ala Phe Val Leu Asp  Glu Cys Gln
    2330                 2335                 2340

Asn Leu  Met Phe Trp Thr Asn  Trp Asn Glu Gln His  Pro Ser Ile
    2345                 2350                 2355

Met Arg  Ala Ala Leu Ser Gly  Ala Asn Val Leu Thr  Leu Ile Glu
    2360                 2365                 2370

Lys Asp  Ile Arg Thr Pro Asn  Gly Leu Ala Ile Asp  His Arg Ala
    2375                 2380                 2385

Glu Lys  Leu Tyr Phe Ser Asp  Ala Thr Leu Asp Lys  Ile Glu Arg
    2390                 2395                 2400
```

```
Cys Glu  Tyr Asp Gly Ser His  Arg Tyr Val Ile Leu  Lys Ser Glu
    2405                 2410                 2415

Pro Val  His Pro Phe Gly Leu  Ala Val Tyr Gly Glu  His Ile Phe
    2420                 2425                 2430

Trp Thr  Asp Trp Val Arg Arg  Ala Val Gln Arg Ala  Asn Lys His
    2435                 2440                 2445

Val Gly  Ser Asn Met Lys Leu  Leu Arg Val Asp Ile  Pro Gln Gln
    2450                 2455                 2460

Pro Met  Gly Ile Ile Ala Val  Ala Asn Asp Thr Asn  Ser Cys Glu
    2465                 2470                 2475

Leu Ser  Pro Cys Arg Ile Asn  Asn Gly Gly Cys Gln  Asp Leu Cys
    2480                 2485                 2490

Leu Leu  Thr His Gln Gly His  Val Asn Cys Ser Cys  Arg Gly Gly
    2495                 2500                 2505

Arg Ile  Leu Gln Asp Asp Leu  Thr Cys Arg Ala Val  Asn Ser Ser
    2510                 2515                 2520

Cys Arg  Ala Gln Asp Glu Phe  Glu Cys Ala Asn Gly  Glu Cys Ile
    2525                 2530                 2535

Asn Phe  Ser Leu Thr Cys Asp  Gly Val Pro His Cys  Lys Asp Lys
    2540                 2545                 2550

Ser Asp  Glu Lys Pro Ser Tyr  Cys Asn Ser Arg Arg  Cys Lys Lys
    2555                 2560                 2565

Thr Phe  Arg Gln Cys Ser Asn  Gly Arg Cys Val Ser  Asn Met Leu
    2570                 2575                 2580

Trp Cys  Asn Gly Ala Asp Asp  Cys Gly Asp Gly Ser  Asp Glu Ile
    2585                 2590                 2595

Pro Cys  Asn Lys Thr Ala Cys  Gly Val Gly Glu Phe  Arg Cys Arg
    2600                 2605                 2610

Asp Gly  Thr Cys Ile Gly Asn  Ser Ser Arg Cys Asn  Gln Phe Val
    2615                 2620                 2625

Asp Cys  Glu Asp Ala Ser Asp  Glu Met Asn Cys Ser  Ala Thr Asp
```

```
    2630                2635                2640

Cys Ser  Ser Tyr Phe Arg Leu  Gly Val Lys Gly Val  Leu Phe Gln
    2645                2650                2655

Pro Cys  Glu Arg Thr Ser Leu  Cys Tyr Ala Pro Ser  Trp Val Cys
    2660                2665                2670

Asp Gly  Ala Asn Asp Cys Gly  Asp Tyr Ser Asp Glu  Arg Asp Cys
    2675                2680                2685

Pro Gly  Val Lys Arg Pro Arg  Cys Pro Leu Asn Tyr  Phe Ala Cys
    2690                2695                2700

Pro Ser  Gly Arg Cys Ile Pro  Met Ser Trp Thr Cys  Asp Lys Glu
    2705                2710                2715

Asp Asp  Cys Glu His Gly Glu  Asp Glu Thr His Cys  Asn Lys Phe
    2720                2725                2730

Cys Ser  Glu Ala Gln Phe Glu  Cys Gln Asn His Arg  Cys Ile Ser
    2735                2740                2745

Lys Gln  Trp Leu Cys Asp Gly  Ser Asp Asp Cys Gly  Asp Gly Ser
    2750                2755                2760

Asp Glu  Ala Ala His Cys Glu  Gly Lys Thr Cys Gly  Pro Ser Ser
    2765                2770                2775

Phe Ser  Cys Pro Gly Thr His  Val Cys Val Pro Glu  Arg Trp Leu
    2780                2785                2790

Cys Asp  Gly Asp Lys Asp Cys  Ala Asp Gly Ala Asp  Glu Ser Ile
    2795                2800                2805

Ala Ala  Gly Cys Leu Tyr Asn  Ser Thr Cys Asp Asp  Arg Glu Phe
    2810                2815                2820

Met Cys  Gln Asn Arg Gln Cys  Ile Pro Lys His Phe  Val Cys Asp
    2825                2830                2835

His Asp  Arg Asp Cys Ala Asp  Gly Ser Asp Glu Ser  Pro Glu Cys
    2840                2845                2850

Glu Tyr  Pro Thr Cys Gly Pro  Ser Glu Phe Arg Cys  Ala Asn Gly
    2855                2860                2865
```

```
Arg Cys  Leu Ser Ser Arg Gln  Trp Glu Cys Asp Gly  Glu Asn Asp
    2870                 2875                 2880

Cys His  Asp Gln Ser Asp Glu  Ala Pro Lys Asn Pro  His Cys Thr
    2885                 2890                 2895

Ser Gln  Glu His Lys Cys Asn  Ala Ser Ser Gln Phe  Leu Cys Ser
    2900                 2905                 2910

Ser Gly  Arg Cys Val Ala Glu  Ala Leu Leu Cys Asn  Gly Gln Asp
    2915                 2920                 2925

Asp Cys  Gly Asp Ser Ser Asp  Glu Arg Gly Cys His  Ile Asn Glu
    2930                 2935                 2940

Cys Leu  Ser Arg Lys Leu Ser  Gly Cys Ser Gln Asp  Cys Glu Asp
    2945                 2950                 2955

Leu Lys  Ile Gly Phe Lys Cys  Arg Cys Arg Pro Gly  Phe Arg Leu
    2960                 2965                 2970

Lys Asp  Asp Gly Arg Thr Cys  Ala Asp Val Asp Glu  Cys Ser Thr
    2975                 2980                 2985

Thr Phe  Pro Cys Ser Gln Arg  Cys Ile Asn Thr His  Gly Ser Tyr
    2990                 2995                 3000

Lys Cys  Leu Cys Val Glu Gly  Tyr Ala Pro Arg Gly  Gly Asp Pro
    3005                 3010                 3015

His Ser  Cys Lys Ala Val Thr  Asp Glu Glu Pro Phe  Leu Ile Phe
    3020                 3025                 3030

Ala Asn  Arg Tyr Tyr Leu Arg  Lys Leu Asn Leu Asp  Gly Ser Asn
    3035                 3040                 3045

Tyr Thr  Leu Leu Lys Gln Gly  Leu Asn Asn Ala Val  Ala Leu Asp
    3050                 3055                 3060

Phe Asp  Tyr Arg Glu Gln Met  Ile Tyr Trp Thr Asp  Val Thr Thr
    3065                 3070                 3075

Gln Gly  Ser Met Ile Arg Arg  Met His Leu Asn Gly  Ser Asn Val
    3080                 3085                 3090

Gln Val  Leu His Arg Thr Gly  Leu Ser Asn Pro Asp  Gly Leu Ala
    3095                 3100                 3105
```

```
Val Asp  Trp Val Gly Gly Asn  Leu Tyr Trp Cys Asp  Lys Gly Arg
    3110                 3115                 3120

Asp Thr  Ile Glu Val Ser Lys  Leu Asn Gly Ala Tyr  Arg Thr Val
    3125                 3130                 3135

Leu Val  Ser Ser Gly Leu Arg  Glu Pro Arg Ala Leu  Val Val Asp
    3140                 3145                 3150

Val Gln  Asn Gly Tyr Leu Tyr  Trp Thr Asp Trp Gly  Asp His Ser
    3155                 3160                 3165

Leu Ile  Gly Arg Ile Gly Met  Asp Gly Ser Ser Arg  Ser Val Ile
    3170                 3175                 3180

Val Asp  Thr Lys Ile Thr Trp  Pro Asn Gly Leu Thr  Leu Asp Tyr
    3185                 3190                 3195

Val Thr  Glu Arg Ile Tyr Trp  Ala Asp Ala Arg Glu  Asp Tyr Ile
    3200                 3205                 3210

Glu Phe  Ala Ser Leu Asp Gly  Ser Asn Arg His Val  Val Leu Ser
    3215                 3220                 3225

Gln Asp  Ile Pro His Ile Phe  Ala Leu Thr Leu Phe  Glu Asp Tyr
    3230                 3235                 3240

Val Tyr  Trp Thr Asp Trp Glu  Thr Lys Ser Ile Asn  Arg Ala His
    3245                 3250                 3255

Lys Thr  Thr Gly Thr Asn Lys  Thr Leu Leu Ile Ser  Thr Leu His
    3260                 3265                 3270

Arg Pro  Met Asp Leu His Val  Phe His Ala Leu Arg  Gln Pro Asp
    3275                 3280                 3285

Val Pro  Asn His Pro Cys Lys  Val Asn Asn Gly Gly  Cys Ser Asn
    3290                 3295                 3300

Leu Cys  Leu Leu Ser Pro Gly  Gly Gly His Lys Cys  Ala Cys Pro
    3305                 3310                 3315

Thr Asn  Phe Tyr Leu Gly Ser  Asp Gly Arg Thr Cys  Val Ser Asn
    3320                 3325                 3330

Cys Thr  Ala Ser Gln Phe Val  Cys Lys Asn Asp Lys  Cys Ile Pro
    3335                 3340                 3345
```

```
Phe Trp  Trp Lys Cys Asp Thr  Glu Asp Asp Cys Gly  Asp His Ser
    3350                 3355                 3360

Asp Glu  Pro Pro Asp Cys Pro  Glu Phe Lys Cys Arg  Pro Gly Gln
    3365                 3370                 3375

Phe Gln  Cys Ser Thr Gly Ile  Cys Thr Asn Pro Ala  Phe Ile Cys
    3380                 3385                 3390

Asp Gly  Asp Asn Asp Cys Gln  Asp Asn Ser Asp Glu  Ala Asn Cys
    3395                 3400                 3405

Asp Ile  His Val Cys Leu Pro  Ser Gln Phe Lys Cys  Thr Asn Thr
    3410                 3415                 3420

Asn Arg  Cys Ile Pro Gly Ile  Phe Arg Cys Asn Gly  Gln Asp Asn
    3425                 3430                 3435

Cys Gly  Asp Gly Glu Asp Glu  Arg Asp Cys Pro Glu  Val Thr Cys
    3440                 3445                 3450

Ala Pro  Asn Gln Phe Gln Cys  Ser Ile Thr Lys Arg  Cys Ile Pro
    3455                 3460                 3465

Arg Val  Trp Val Cys Asp Arg  Asp Asn Asp Cys Val  Asp Gly Ser
    3470                 3475                 3480

Asp Glu  Pro Ala Asn Cys Thr  Gln Met Thr Cys Gly  Val Asp Glu
    3485                 3490                 3495

Phe Arg  Cys Lys Asp Ser Gly  Arg Cys Ile Pro Ala  Arg Trp Lys
    3500                 3505                 3510

Cys Asp  Gly Glu Asp Asp Cys  Gly Asp Gly Ser Asp  Glu Pro Lys
    3515                 3520                 3525

Glu Glu  Cys Asp Glu Arg Thr  Cys Glu Pro Tyr Gln  Phe Arg Cys
    3530                 3535                 3540

Lys Asn  Asn Arg Cys Val Pro  Gly Arg Trp Gln Cys  Asp Tyr Asp
    3545                 3550                 3555

Asn Asp  Cys Gly Asp Asn Ser  Asp Glu Glu Ser Cys  Thr Pro Arg
    3560                 3565                 3570

Pro Cys  Ser Glu Ser Glu Phe  Ser Cys Ala Asn Gly  Arg Cys Ile
```

```
    3575                3580                3585

Ala Gly  Arg Trp Lys Cys Asp  Gly Asp His Asp Cys  Ala Asp Gly
    3590                3595                3600

Ser Asp  Glu Lys Asp Cys Thr  Pro Arg Cys Asp Met  Asp Gln Phe
    3605                3610                3615

Gln Cys  Lys Ser Gly His Cys  Ile Pro Leu Arg Trp  Arg Cys Asp
    3620                3625                3630

Ala Asp  Ala Asp Cys Met Asp  Gly Ser Asp Glu Glu  Ala Cys Gly
    3635                3640                3645

Thr Gly  Val Arg Thr Cys Pro  Leu Asp Glu Phe Gln  Cys Asn Asn
    3650                3655                3660

Thr Leu  Cys Lys Pro Leu Ala  Trp Lys Cys Asp Gly  Glu Asp Asp
    3665                3670                3675

Cys Gly  Asp Asn Ser Asp Glu  Asn Pro Glu Glu Cys  Ala Arg Phe
    3680                3685                3690

Val Cys  Pro Pro Asn Arg Pro  Phe Arg Cys Lys Asn  Asp Arg Val
    3695                3700                3705

Cys Leu  Trp Ile Gly Arg Gln  Cys Asp Gly Thr Asp  Asn Cys Gly
    3710                3715                3720

Asp Gly  Thr Asp Glu Glu Asp  Cys Glu Pro Pro Thr  Ala His Thr
    3725                3730                3735

Thr His  Cys Lys Asp Lys Lys  Glu Phe Leu Cys Arg  Asn Gln Arg
    3740                3745                3750

Cys Leu  Ser Ser Ser Leu Arg  Cys Asn Met Phe Asp  Asp Cys Gly
    3755                3760                3765

Asp Gly  Ser Asp Glu Glu Asp  Cys Ser Ile Asp Pro  Lys Leu Thr
    3770                3775                3780

Ser Cys  Ala Thr Asn Ala Ser  Ile Cys Gly Asp Glu  Ala Arg Cys
    3785                3790                3795

Val Arg  Thr Glu Lys Ala Ala  Tyr Cys Ala Cys Arg  Ser Gly Phe
    3800                3805                3810
```

```
His Thr  Val Pro Gly Gln Pro  Gly Cys Gln Asp Ile  Asn Glu Cys
    3815                 3820                 3825

Leu Arg  Phe Gly Thr Cys Ser  Gln Leu Cys Asn Asn  Thr Lys Gly
    3830                 3835                 3840

Gly His  Leu Cys Ser Cys Ala  Arg Asn Phe Met Lys  Thr His Asn
    3845                 3850                 3855

Thr Cys  Lys Ala Glu Gly Ser  Glu Tyr Gln Val Leu  Tyr Ile Ala
    3860                 3865                 3870

Asp Asp  Asn Glu Ile Arg Ser  Leu Phe Pro Gly His  Pro His Ser
    3875                 3880                 3885

Ala Tyr  Glu Gln Ala Phe Gln  Gly Asp Glu Ser Val  Arg Ile Asp
    3890                 3895                 3900

Ala Met  Asp Val His Val Lys  Ala Gly Arg Val Tyr  Trp Thr Asn
    3905                 3910                 3915

Trp His  Thr Gly Thr Ile Ser  Tyr Arg Ser Leu Pro  Pro Ala Ala
    3920                 3925                 3930

Pro Pro  Thr Thr Ser Asn Arg  His Arg Arg Gln Ile  Asp Arg Gly
    3935                 3940                 3945

Val Thr  His Leu Asn Ile Ser  Gly Leu Lys Met Pro  Arg Gly Ile
    3950                 3955                 3960

Ala Ile  Asp Trp Val Ala Gly  Asn Val Tyr Trp Thr  Asp Ser Gly
    3965                 3970                 3975

Arg Asp  Val Ile Glu Val Ala  Gln Met Lys Gly Glu  Asn Arg Lys
    3980                 3985                 3990

Thr Leu  Ile Ser Gly Met Ile  Asp Glu Pro His Ala  Ile Val Val
    3995                 4000                 4005

Asp Pro  Leu Arg Gly Thr Met  Tyr Trp Ser Asp Trp  Gly Asn His
    4010                 4015                 4020

Pro Lys  Ile Glu Thr Ala Ala  Met Asp Gly Thr Leu  Arg Glu Thr
    4025                 4030                 4035

Leu Val  Gln Asp Asn Ile Gln  Trp Pro Thr Gly Leu  Ala Val Asp
    4040                 4045                 4050
```

```
Tyr His  Asn Glu Arg Leu Tyr  Trp Ala Asp Ala Lys  Leu Ser Val
    4055                 4060                 4065

Ile Gly  Ser Ile Arg Leu Asn  Gly Thr Asp Pro Ile  Val Ala Ala
    4070                 4075                 4080

Asp Ser  Lys Arg Gly Leu Ser  His Pro Phe Ser Ile  Asp Val Phe
    4085                 4090                 4095

Glu Asp  Tyr Ile Tyr Gly Val  Thr Tyr Ile Asn Asn  Arg Val Phe
    4100                 4105                 4110

Lys Ile  His Lys Phe Gly His  Ser Pro Leu Val Asn  Leu Thr Gly
    4115                 4120                 4125

Gly Leu  Ser His Ala Ser Asp  Val Val Leu Tyr His  Gln His Lys
    4130                 4135                 4140

Gln Pro  Glu Val Thr Asn Pro  Cys Asp Arg Lys Lys  Cys Glu Trp
    4145                 4150                 4155

Leu Cys  Leu Leu Ser Pro Ser  Gly Pro Val Cys Thr  Cys Pro Asn
    4160                 4165                 4170

Gly Lys  Arg Leu Asp Asn Gly  Thr Cys Val Pro Val  Pro Ser Pro
    4175                 4180                 4185

Thr Pro  Pro Pro Asp Ala Pro  Arg Pro Gly Thr Cys  Asn Leu Gln
    4190                 4195                 4200

Cys Phe  Asn Gly Gly Ser Cys  Phe Leu Asn Ala Arg  Arg Gln Pro
    4205                 4210                 4215

Lys Cys  Arg Cys Gln Pro Arg  Tyr Thr Gly Asp Lys  Cys Glu Leu
    4220                 4225                 4230

Asp Gln  Cys Trp Glu His Cys  Arg Asn Gly Gly Thr  Cys Ala Ala
    4235                 4240                 4245

Ser Pro  Ser Gly Met Pro Thr  Cys Arg Cys Pro Thr  Gly Phe Thr
    4250                 4255                 4260

Gly Pro  Lys Cys Thr Gln Gln  Val Cys Ala Gly Tyr  Cys Ala Asn
    4265                 4270                 4275

Asn Ser  Thr Cys Thr Val Asn  Gln Gly Asn Gln Pro  Gln Cys Arg
    4280                 4285                 4290
```

```
Cys Leu  Pro Gly Phe Leu Gly  Asp Arg Cys Gln Tyr  Arg Gln Cys
    4295                 4300                 4305

Ser Gly  Tyr Cys Glu Asn Phe  Gly Thr Cys Gln Met  Ala Ala Asp
    4310                 4315                 4320

Gly Ser  Arg Gln Cys Arg Cys  Thr Ala Tyr Phe Glu  Gly Ser Arg
    4325                 4330                 4335

Cys Glu  Val Asn Lys Cys Ser  Arg Cys Leu Glu Gly  Ala Cys Val
    4340                 4345                 4350

Val Asn  Lys Gln Ser Gly Asp  Val Thr Cys Asn Cys  Thr Asp Gly
    4355                 4360                 4365

Arg Val  Ala Pro Ser Cys Leu  Thr Cys Val Gly His  Cys Ser Asn
    4370                 4375                 4380

Gly Gly  Ser Cys Thr Met Asn  Ser Lys Met Met Pro  Glu Cys Gln
    4385                 4390                 4395

Cys Pro  Pro His Met Thr Gly  Pro Arg Cys Glu Glu  His Val Phe
    4400                 4405                 4410

Ser Gln  Gln Gln Pro Gly His  Ile Ala Ser Ile Leu  Ile Pro Leu
    4415                 4420                 4425

Leu Leu  Leu Leu Leu Leu Val  Leu Val Ala Gly Val  Val Phe Trp
    4430                 4435                 4440

Tyr Lys  Arg Arg Val Gln Gly  Ala Lys Gly Phe Gln  His Gln Arg
    4445                 4450                 4455

Met Thr  Asn Gly Ala Met Asn  Val Glu Ile Gly Asn  Pro Thr Tyr
    4460                 4465                 4470

Lys Met  Tyr Glu Gly Gly Glu  Pro Asp Asp Val Gly  Gly Leu Leu
    4475                 4480                 4485

Asp Ala  Asp Phe Ala Leu Asp  Pro Asp Lys Pro Thr  Asn Phe Thr
    4490                 4495                 4500

Asn Pro  Val Tyr Ala Thr Leu  Tyr Met Gly Gly His  Gly Ser Arg
    4505                 4510                 4515

His Ser  Leu Ala Ser Thr Asp  Glu Lys Arg Glu Leu  Leu Gly Arg
```

4520 4525 4530

Gly Pro Glu Asp Glu Ile Gly Asp Pro Leu Ala
4535 4540

<210> 11
<211> 7783
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgccgccg 60

agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcggcggcg 120

gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga 180

cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug 240

ggccucccccg agccgggccc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug 300

cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa 360

gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucccc 420

ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc 480

cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa 540

cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu 600

ugcaccaagc aggugugucc ugcagagaag cugagcugug gacccaccag ccacaagugu 660

guaccugccu cguggcgcug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720

ggcugugcua ccuugugcgc cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc 780

gccguguucg ugugcgacgg cgacgacgac uguggugacg gcagcgauga gcgcggcugu 840

gcagacccgg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcggcg gcgauggcgg cggcgccugc 900

aucccggagc gcugggucug cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca 960

gccgagcucu gcggccgucc gggccccggg gccacguccg cgcccgccgc cugcgccacc 1020

gccucccagu ucgccugccg cagcggcgag ugcgugcacc ugggcuggcg cugcgacggc 1080

gaccgcgacu gcaaagacaa aucggacgag gccgacugcc cacugggcac cugccguggg 1140

gacgaguucc aguguggggа ugggacaugu guccuugcaa ucaagcacug caaccaggag 1200

caggacuguc cagaugggag ugaugaagcu ggcugccuac aggggcugaa cgagugucug 1260

cacaacaaug gcggcugcuc acacaucugc acugaccuca agauuggcuu ugaaugcacg 1320

ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag 1380

gacccagaug ccugcagcca gaucuguguc aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc 1440

uacccuggcu acgagaugga ccuacugacc aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc 1500

ccaucccuaa ucuucaccaa ccggcacgag gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac 1560

uauucacgcc ucaucccCau gcucaagaau gucguggcac uagaugugga aguugccacc 1620

aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac cguaagaucu auagcgccua cauggacaag 1680

gccagugacc cgaaagagca ggagguccuc auugacgagc aguugcacuc uccagagggc 1740

cuggcagugg acugggucca caagcacauc uacuggacug acucgggcaa uaagaccauc 1800

ucaguggcca caguugaugg uggccgccga cgcacucucu ucagccguaa ccucagugaa 1860

ccccgggcca ucgcuguuga cccccugcga ggguucaugu auuggucuga cuggggggac 1920

caggccaaga uugagaaauc ugggcucaac gguguggacc ggcaaacacu ggugucagac 1980

aauauugaau ggcccaacgg aaucacccug gaucugcuga gccagcgcuu guacugggua 2040

gacuccaagc uacaccaacu guccagcauu gacuucagug gaggcaacag aaagacgcug 2100

aucuccucca cugacuuccu gagccacccu uuugggauag cuguguuuga ggacaaggug 2160

uucuggacag accuggagaa cgaggccauu uucagugcaa aucggcucaa uggccuggaa 2220

aucuccaucc uggcugagaa ccucaacaac ccacaugaca uugucaucuu ccaugagcug 2280

aagcagccaa gagcuccaga ugccugugag cugagugucc agccuaaugg aggcugugaa 2340

uaccugugcc uuccugcucc ucagaucucc agccacucuc ccaaguacac augugccugu 2400

ccugacacaa uguggcuggg uccagacaug aagaggugcu accgagcacc ucaaucuacc 2460

ucaacuacga cguuagcuuc uaccaugacg aggacaguac cugccaccac aagagccccc 2520

gggaccaccg uccacagauc caccuaccag aaccacagca cagagacacc aagccugaca 2580

gcugcagucc caagcucagu uaguguCccc agggcuccca gcaucagccc gucuacccua 2640

agcccugcaa ccagcaacca cucccagcac uaugcaaaug aagacaguaa gaugggcuca 2700

acagucacug ccgcuguuau cgggaucauc gugcccauag uggugauagc ccuccugugc 2760

augaguggau accugaucug gagaaacugg aagcggaaga acaccaaaag caugaauuuu 2820

gacaacccag ucuacaggaa aacaacagaa gaagaagacg aagaugagcu ccauauaggg 2880

agaacugcuc agauuggcca ugucuauccu gcagcaauca gcagcuuuga ucgcccacug 2940

ugggcagagc ccugucuugg ggagaccaga gaaccggaag acccagcccc ugcccucaag 3000

gagcuuuuug ucuugccggg ggaaccaagg ucacagcugc accaacuccc gaagaacccu 3060

cuuuccgagc ugccugucgu caaauccaag cgaguggcau uaagccuuga agaugaugga 3120

cuacccugag gaugggauca cccccuucgu gccucaugga auucaguccc augcacuaca 3180

cucuggaugg uguaugacug gaugaauggg uuucuauaua ugggucugug ugaguguaug 3240

ugugugugug auuuuuuuuu uaaauuuaug uugcggaaag guaaccacaa aguuaugaug 3300

aacugcaaac auccaaagga ugugagaguu uuucuaugua uaauguuuua uacacuuuuu 3360

aacugguugc acuacccaug aggaauucgu ggaauggcua cugcugacua acaugaugca 3420

cauaaccaaa uggggggccaa uggcacagua ccuuacucau cauuuaaaaa cuauauuuac 3480

agaagauguu ugguugcugg gggggcuuuu uuagguuuug gggcauuugu uuuuuguaaa 3540

uaagaugauu augcuuugug gcuauccauc aacauaagua aaaaaaaaaa aaaaacacuu 3600

caacucccuc ccccauuuag auuauuuauu aacauauuuu aaaaaucaga ugaguucuau 3660

aaauaauuua gagaagugag aguauuuauu uuuggcaugu uuggcccacc acacagacuc 3720

ugugugugua uguguguguu uauaugugua ugugugugac agaaaaaucu guagagaaga 3780

ggcacaucua uggcuacugu ucaaauacau aaagauaaau uuauuuucac acaguccaca 3840

agggguauau cuuguaguuu ucagaaaagc cuuuggaaau cuggaucaga aaauagauac 3900

caugguuugu gcaauuaugu aguaaaaaag gcaaaucuuu ucaccucugg cuauuccuga 3960

gaccccagga agucaggaaa agccuuucag cucacccaug gcugcuguga cuccuaccag 4020

ggcuuucuug gcuuuggcga aggucagugu acagacauuc caugguacca gagugcucag 4080

aaacucaaga uaggauaugc cucacccuca gcuacuccuu guuuuaaagu ucagcucuuu 4140

gaguaacuuc uucaauuucu uucaggacac uuggguugaa uucaguaagu uuccucugaa 4200

gcacccugaa gggugccauc cuuacagagc uaaguggaga cguuuccaga ucagcccaag 4260

uuuacuauag agacuggccc aggcacugaa ugucuaggac augcugugga ugaagauaaa 4320

gaugguggaa uagguuuuau cacaucucuu auuucucuuu uccccuuacu cucuaccauu 4380

uccuuuaugu ggggaaacau uuuaagguaa uaaauagguu acuuaccauc auauguucau 4440

auagaugaaa cuaauuuuug gcuuaaguca gaacaacugg ccaaaauuga agucauauuu 4500

gaggggggaa auggcauacg caauauuaua uuauauugga uauuuauguu cacacaggaa 4560

uuugguuuac ugcuuuguaa auaaaaggaa aaacuccggg uauauguaua gauguucuuc 4620

auuauagaca ucuucuuugc uuuucuuggc cuuggggggag gaagggagaa gugcucuuuu 4680

cuacuugugg ggucucccau uggaaacaua auccuauagu cccagaagga uucagucccc 4740

aguggcuuuc ccauccaaag agaaagaguu ugaguuucuu aacucugcug uucugccacu 4800

uacucccacu agacaaccag ggacaaggug caacauggaa guguuugacu uaaguaggag 4860

cagaggagcu gcaucuaauc ucaucauacc uggaacuuga cacacuuaag caaaugccuu 4920

cccaucccua ccugccagau gcccccaacu caaugaaguu ggaugucuca ccagcuugau 4980

acccuuugaa uuuucaguca gacauucugg aguucuagca uccuguaccu aggaccuucc 5040

ucugugucac ucuuggccuc cuaaacucua agaaaauaac uauauucugg agcuugggca 5100

guguguuuug cauaauccag caaucuccuc augacaugca uguguugaua guccugaaac 5160

auucauugag aggguaaaug caguugaccu agaaugacca auaccaaaca gaauuuuaag 5220

aacagguggc caacuccuau ggagcuuacu cacauauuac uauucuuuua agaacggaaa 5280

guaaaauuau uuuugacuga agaaaaauga ugacagugaa aaacauggaa auguacucaa 5340

aacaagugac uuuuucugua accuuccaaa gaaacugaau uuuccaagga auuaaaugau 5400

aacaguggcu aaggcauagu uucuaaacuu ucaguaagau ccuggcauuc acagaaaaaa 5460

augaugaaug gggucuggac auacagccug agaucucaaa augacaauga aauucacaac 5520

uuuuucucag agacauucau guuuccugca uaugcuacaa cugcaguuug aaagaggcag 5580

caaugggagc aacccuuuac aagaaacaaa uugugauaua uucauguguu ggacggcagu 5640

aaauaagaug aaaccugagg agucagaucc accuuccccc auucauagag gcuuuucagc 5700

cucauuuuga gguacaguua cauaucuuuu gccuuuugcc cccgugcaua gcuaucuaca 5760

gccaaucaca gaucacagag ucacuggacu auagagcugg aaggaagcuc agagacaaug 5820

ccaagggggc agaaaauuua ucagaagcca gucccagugc guuuccucca uuuccuucug 5880

caggaagacu auuuugggcu gccugaacau uguaucaaac cugcuaccua uacuaugguc 5940

uaccuuuccu ccaguggaau uacaaaggca cuaacugaaa ugccuucuag aaacagagaa 6000

aacgaaacug uacuuauuua cucuugauac acagauuauu uauaaaacag auugaaguaa 6060

ccuguuaacu ggcaaaaaga gaaugagauc ggauuuaaau guauggcagu aaguccuauu 6120

gaucccucca guuaucucag uaugacugca guauauucau ucacuaaaac cacucacuag 6180

auaccaacua cacaccuggc acugcagaug uaaaggucag ucacacaugu ucugacuuua 6240

cagaguucac aguagcagug gaggaugaua uauguggaaa caaaaaaggc auugauucua 6300

uucagagcac uguuagggcu caaaggagag aggggucuuu ccaccuaaga aaugaggaau 6360

agggucauca uagaagugac cuuaagucuu aaaaauuaag aaggggauuc caagcugcuu 6420

cagacagaga cacaucgagc uaaaacacag agguaugaaa gagcacaggg acuuuaggaa 6480

uugcacaguu cauucuaaca ggaacaaaag gcucaagggg ggcaagaaau gaggcuguau 6540

ggaaagagau ucaauguaag cacuuuauaa aauagauuaa uuucugauuc aaugaagcau 6600

uucuugauca uuguguacaa ggcacuacau gcaucaugga aaauucauua ggaugcauug 6660

ccagcacuuu gcagaacuga uauuauucag ccucaagcuu uccaguggcc aaagggaaau 6720

gcugacugcu uuucauauau uugagucaaa gauuuuuuau auggucaaug aagacuaaua 6780

uaagggcagu gggauuuuca cagaugcaug ccauguuguc gagagccucu uagauuuucu 6840

caacugugag aaagaaaaac gaaaauguug aagacguuga gucuggagag gggauacuaa 6900

ucacugucca guugggcacu ggugggaaug gggaaauggc acaggaaugc aagccucucc 6960

acccuacccc ccgaacucca gccauacacu caucguuuca caaaauauaa augaguuagc 7020

auuaaauguu ucagaguaaa uaauuccuuu ucccgaaaug caugaagaua gaguaacaga 7080

cuucucacac uguauuuuua ggguauggag aauuuagaag guuaaagaau uacugcuuca 7140

auuuuucagu uaaaaaaaaa ucaggaagcu cuguucauuc aggcuaugca ccaugugcac 7200

agucaagaau uagcagaaac ccucugcauu uacaaacacu uugugcuaua aaaaaguaau 7260

uuuuaaaaag ccacgugugu guguguguau auauauauau auauauauau uuaaagccaa 7320

gguuuugaua cuuuuuuaca aaaacuacaa gagaaaacaa auauaccugu ccaaaccaua 7380

uacuuuuaaa agagcauuuu uuuuuccaua caagcuguug uuaauuuggg gguaaagugc 7440

ugauuugcaa acuucaucaa auuguuccca aguggauucu ccuuguuugu cucccccuac 7500

caaccccaaa guuaccauau uugauguaag aaucaggcau guuagaaugu ugugucacac 7560

uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau ucaaguuccg uuagcuucug uacgcggugc 7620

ccuuugcagu cuggugucuc uuccagaggc gaggggggcug aggaugggggu gcugcaucuc 7680

acuagcuaua cuggcaucau cuugguaaac ugaaaaccaa auguggacau uuguaaaauc 7740

agugcacugu uucuagagag agauuaaauu cauuuaaaaa aaa 7783

<210> 12
<211> 963
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Gly Leu Pro Glu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln His Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Asp Pro Leu Leu Gly Gly Gln Gly Pro Ala Lys Asp Cys Glu
35 40 45

Lys Asp Gln Phe Gln Cys Arg Asn Glu Arg Cys Ile Pro Ser Val Trp
50 55 60

Arg Cys Asp Glu Asp Asp Asp Cys Leu Asp His Ser Asp Glu Asp Asp
65 70 75 80

Cys Pro Lys Lys Thr Cys Ala Asp Ser Asp Phe Thr Cys Asp Asn Gly
85 90 95

His Cys Ile His Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Glu Glu Cys Pro
100 105 110

Asp Gly Ser Asp Glu Ser Glu Ala Thr Cys Thr Lys Gln Val Cys Pro
115 120 125

Ala Glu Lys Leu Ser Cys Gly Pro Thr Ser His Lys Cys Val Pro Ala
130 135 140

```
Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Lys Asp Cys Glu Gly Gly Ala Asp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Gly Cys Ala Thr Leu Cys Ala Pro His Glu Phe Gln Cys Gly Asn
                165                 170                 175

Arg Ser Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys
            180                 185                 190

Gly Asp Gly Ser Asp Glu Arg Gly Cys Ala Asp Pro Ala Cys Gly Pro
        195                 200                 205

Arg Glu Phe Arg Cys Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ala Cys Ile Pro Glu
    210                 215                 220

Arg Trp Val Cys Asp Arg Gln Phe Asp Cys Glu Asp Arg Ser Asp Glu
225                 230                 235                 240

Ala Ala Glu Leu Cys Gly Arg Pro Gly Pro Gly Ala Thr Ser Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Ala Cys Ala Thr Ala Ser Gln Phe Ala Cys Arg Ser Gly Glu Cys
            260                 265                 270

Val His Leu Gly Trp Arg Cys Asp Gly Asp Arg Asp Cys Lys Asp Lys
        275                 280                 285

Ser Asp Glu Ala Asp Cys Pro Leu Gly Thr Cys Arg Gly Asp Glu Phe
    290                 295                 300

Gln Cys Gly Asp Gly Thr Cys Val Leu Ala Ile Lys His Cys Asn Gln
305                 310                 315                 320

Glu Gln Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Gln Gly
                325                 330                 335

Leu Asn Glu Cys Leu His Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Thr
            340                 345                 350

Asp Leu Lys Ile Gly Phe Glu Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Gln Leu
        355                 360                 365

Leu Asp Gln Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Pro Asp
    370                 375                 380

Ala Cys Ser Gln Ile Cys Val Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Lys Cys Glu
```

385 390 395 400

Cys Tyr Pro Gly Tyr Glu Met Asp Leu Leu Thr Lys Asn Cys Lys Ala
405 410 415

Ala Ala Gly Lys Ser Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg His Glu Val
420 425 430

Arg Arg Ile Asp Leu Val Lys Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ile Pro Met
435 440 445

Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Asp Val Glu Val Ala Thr Asn Arg Ile
450 455 460

Tyr Trp Cys Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Ala Tyr Met Asp
465 470 475 480

Lys Ala Ser Asp Pro Lys Glu Gln Glu Val Leu Ile Asp Glu Gln Leu
485 490 495

His Ser Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Lys His Ile Tyr
500 505 510

Trp Thr Asp Ser Gly Asn Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Val Asp Gly
515 520 525

Gly Arg Arg Arg Thr Leu Phe Ser Arg Asn Leu Ser Glu Pro Arg Ala
530 535 540

Ile Ala Val Asp Pro Leu Arg Gly Phe Met Tyr Trp Ser Asp Trp Gly
545 550 555 560

Asp Gln Ala Lys Ile Glu Lys Ser Gly Leu Asn Gly Val Asp Arg Gln
565 570 575

Thr Leu Val Ser Asp Asn Ile Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp
580 585 590

Leu Leu Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Gln Leu
595 600 605

Ser Ser Ile Asp Phe Ser Gly Gly Asn Arg Lys Thr Leu Ile Ser Ser
610 615 620

Thr Asp Phe Leu Ser His Pro Phe Gly Ile Ala Val Phe Glu Asp Lys
625 630 635 640

```
Val Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg
                645                 650                 655

Leu Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala Glu Asn Leu Asn Asn Pro
            660                 665                 670

His Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys Gln Pro Arg Ala Pro Asp
        675                 680                 685

Ala Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys
    690                 695                 700

Leu Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ala
705                 710                 715                 720

Cys Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp Met Lys Arg Cys Tyr Arg
                725                 730                 735

Ala Pro Gln Ser Thr Ser Thr Thr Thr Leu Ala Ser Thr Met Thr Arg
            740                 745                 750

Thr Val Pro Ala Thr Thr Arg Ala Pro Gly Thr Thr Val His Arg Ser
        755                 760                 765

Thr Tyr Gln Asn His Ser Thr Glu Thr Pro Ser Leu Thr Ala Ala Val
    770                 775                 780

Pro Ser Ser Val Ser Val Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Pro Ser Thr
785                 790                 795                 800

Leu Ser Pro Ala Thr Ser Asn His Ser Gln His Tyr Ala Asn Glu Asp
                805                 810                 815

Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala Val Ile Gly Ile Ile Val
            820                 825                 830

Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met Ser Gly Tyr Leu Ile Trp
        835                 840                 845

Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser Met Asn Phe Asp Asn Pro
    850                 855                 860

Val Tyr Arg Lys Thr Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Leu His Ile
865                 870                 875                 880

Gly Arg Thr Ala Gln Ile Gly His Val Tyr Pro Ala Ala Ile Ser Ser
                885                 890                 895
```

Phe Asp Arg Pro Leu Trp Ala Glu Pro Cys Leu Gly Glu Thr Arg Glu
900 905 910

Pro Glu Asp Pro Ala Pro Ala Leu Lys Glu Leu Phe Val Leu Pro Gly
915 920 925

Glu Pro Arg Ser Gln Leu His Gln Leu Pro Lys Asn Pro Leu Ser Glu
930 935 940

Leu Pro Val Val Lys Ser Lys Arg Val Ala Leu Ser Leu Glu Asp Asp
945 950 955 960

Glv Leu Pro

<210> 13
<211> 7273
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 13
gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgccgccg 60

agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcggcggcg 120

gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga 180

cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug 240

ggccucccgg agccgggccc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug 300

cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa 360

gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucccc 420

ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc 480

cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa 540

cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu 600

ugcaccaagc aggugugucc ugcagagaag cugagcugug gacccaccag ccacaagugu 660

guaccugccu cguggcgcug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720

ggcugugcua ccuggcugaa cgagugucug cacaacaaug gcggcugcuc acacaucugc 780

acugaccuca agauuggcuu ugaaugcacg ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag 840

aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag gacccagaug ccugcagcca gaucuguguc 900

aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc uacccuggcu acgagaugga ccuacugacc 960

aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc ccaucccuaa ucuucaccaa ccggcacgag 1020

gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac uauucacgcc ucaucccccau gcucaagaau 1080

gucguggcac uagaugugga aguugccacc aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac 1140

cguaagaucu auagcgccua cauggacaag gccagugacc cgaaagagca ggaggcccuc 1200

auugacgagc aguugcacuc uccagagggc cuggcagugg acugggucca caagcacauc 1260

uacuggacug acucgggcaa uaagaccauc ucaguggcca caguugaugg uggccgccga 1320

cgcacucucu ucagccguaa ccucagugaa ccccgggcca ucgcuguuga ccccccugcga 1380

ggguucaugu auuggucuga cuggggggac caggccaaga uugagaaauc ugggcucaac 1440

gguguggacc ggcaaacacu ggugucagac aauauugaau ggcccaacgg aaucacccug 1500

gaucugcuga gccagcgcuu guacugggua gacuccaagc uacaccaacu guccagcauu 1560

gacuucagug gaggcaacag aaagacgcug aucuccucca cugacuuccu gagccacccu 1620

uuugggauag cuguguuuga ggacaaggug uucuggacag accuggagaa cgaggccauu 1680

uucagugcaa aucggcucaa uggccuggaa aucuccaucc uggcugagaa ccucaacaac 1740

ccacaugaca uugucaucuu ccaugagcug aagcagccaa gagcuccaga ugccugugag 1800

cugaguguc agccuaaugg aggcugugaa uaccugugcc uuccugcucc ucagaucucc 1860

agccacucuc ccaaguacac augugccugu ccugacacaa uguggcuggg uccagacaug 1920

aagaggugcu accgagcacc ucaaucuacc ucaacuacga cguuagcuuc uaccaugacg 1980

aggacaguac cugccaccac aagagccccc gggaccaccg uccacagauc caccuaccag 2040

aaccacagca cagagacacc aagccugaca gcugcagucc caagcucagu uaguguccc 2100

agggcuccca gcaucagccc gucuacccua agcccugcaa ccagcaacca cucccagcac 2160

uaugcaaaug aagacaguaa gaugggcuca acagucacug ccgcuguuau cgggaucauc 2220

gugcccauag uggugauagc ccuccugugc augaguggau accugaucug gagaaacugg 2280

aagcggaaga acaccaaaag caugaauuuu gacaacccag ucuacaggaa aacaacagaa 2340

gaagaagacg aagaugagcu ccauauaggg agaacugcuc agauuggcca ugucuauccu 2400

gcagcaauca gcagcuuuga ucgcccacug ugggcagagc ccugucuugg ggagaccaga 2460

gaaccggaag acccagcccc ugcccucaag gagcuuuuug ucuugccggg ggaaccaagg 2520

ucacagcugc accaacuccc gaagaacccu cuuuccgagc ugccugucgu caaauccaag 2580

cgaguggcau uaagccuuga agaugaugga cuacccugag gaugggauca cccccuucgu 2640

gccucaugga auucaguccc augcacuaca cucuggaugg uguaugacug gaugaauggg 2700

uuucuauaua ugggucugug ugaguguaug uguguguguug auuuuuuuuu uaaauuuaug 2760

uugcggaaag guaaccacaa aguuaugaug aacugcaaac auccaaagga ugugagaguu 2820

uuucuaugua uaauguuuua uacacuuuuu aacugguugc acuacccaug aggaauucgu 2880

ggaauggcua cugcugacua acaugaugca cauaaccaaa ugggggccaa uggcacagua 2940

ccuuacucau cauuuaaaaa cuauauuuac agaagauguu ugguugcugg gggggcuuuu 3000

uuagguuuug gggcauuugu uuuuuguaaa uaagaugauu augcuuugug gcuauccauc 3060

aacauaagua aaaaaaaaaa aaaaacacuu caacucccuc ccccauuuag auuauuuauu 3120

aacauauuuu aaaaaucaga ugaguucuau aaauaauuua gagaagugag aguauuuauu 3180

uuuggcaugu uuggcccacc acacagacuc ugugugugua uguguguguu uauaugugua 3240

ugugugugac agaaaaaucu guagagaaga ggcacaucua uggcuacugu ucaaauacau 3300

aaagauaaau uuauuuucac acaguccaca agggguauau cuuguaguuu ucagaaaagc 3360

cuuuggaaau cuggaucaga aaauagauac caugguuugu gcaauuaugu aguaaaaaag 3420

gcaaaucuuu ucaccucugg cuauuccuga gaccccagga agucaggaaa agccuuucag 3480

cucacccaug gcugcuguga cuccuaccag ggcuuucuug gcuuuggcga aggucagugu 3540

acagacauuc caugguacca gagugcucag aaacucaaga uaggauaugc cucacccuca 3600

gcuacuccuu guuuuaaagu ucagcucuuu gaguaacuuc uucaauuucu uucaggacac 3660

uuggguugaa uucaguaagu uuccucugaa gcacccugaa gggugccauc cuuacagagc 3720

uaaguggaga cguuuccaga ucagcccaag uuuacuauag agacuggccc aggcacugaa 3780

ugucuaggac augcugugga ugaagauaaa gaugguggaa uagguuuuau cacaucucuu 3840

auuucucuuu uccccuuacu cucuaccauu uccuuuaugu ggggaaacau uuuaagguaa 3900

uaaauagguu acuuaccauc auauguucau auagaugaaa cuaauuuuug gcuuaaguca 3960

gaacaacugg ccaaaauuga agucauauuu gaggggggaa auggcauacg caauauuaua 4020

uuauauugga uauuuauguu cacacaggaa uuugguuuac ugcuuuguaa auaaaaggaa 4080

aaacuccggg uauauguaua gauguucuuc auuauagaca ucuucuuugc uuuucuuggc 4140

cuugggggag gaagggagaa gugcucuuuu cuacuugugg ggucucccau uggaaacaua 4200

auccuauagu cccagaagga uucagucccc aguggcuuuc ccauccaaag agaaagaguu 4260

ugaguuucuu aacucugcug uucugccacu uacucccacu agacaaccag ggacaaggug 4320

caacauggaa guguuugacu uaaguaggag cagaggagcu gcaucuaauc ucaucauacc 4380

uggaacuuga cacacuuaag caaaugccuu cccaucccua ccugccagau gcccccaacu 4440

caaugaaguu ggaugucuca ccagcuugau acccuuugaa uuuucaguca gacauucugg 4500

aguucuagca uccuguaccu aggaccuucc ucugugucac ucuuggccuc cuaaacucua 4560

agaaaauaac uauauucugg agcuugggca guguguuuug cauaauccag caaucuccuc 4620

augacaugca uguguugaua guccugaaac auucauugag aggguaaaug caguugaccu 4680

agaaugacca auaccaaaca gaauuuuaag aacagguggc caacuccuau ggagcuuacu 4740

cacauauuac uauucuuuua agaacggaaa guaaaauuau uuuugacuga agaaaaauga 4800

ugacagugaa aaacauggaa auguacucaa aacaagugac uuuuucugua accuuccaaa 4860

gaaacugaau uuuccaagga auuaaaugau aacaguggcu aaggcauagu uucuaaacuu 4920

ucaguaagau ccuggcauuc acagaaaaaa augaugaaug gggucuggac auacagccug 4980

agaucucaaa augacaauga aauucacaac uuuuucucag agacauucau guuuccugca 5040

uaugcuacaa cugcaguuug aaagaggcag caaugggagc aacccuuuac aagaaacaaa 5100

uugugauaua uucauguguu ggacggcagu aaauaagaug aaaccugagg agucagaucc 5160

accuuccccc auucauagag gcuuuucagc cucauuuuga gguacaguua cauaucuuuu 5220

gccuuuugcc cccgugcaua gcuaucuaca gccaaucaca gaucacagag ucacuggacu 5280

auagagcugg aaggaagcuc agagacaaug ccaagggggc agaaaauuua ucagaagcca 5340

gucccagugc guuuccucca uuuccuucug caggaagacu auuuugggcu gccugaacau 5400

uguaucaaac cugcuaccua uacuaugguc uaccuuuccu ccaguggaau uacaaaggca 5460

cuaacugaaa ugccuucuag aaacagagaa aacgaaacug uacuuauuua cucuugauac 5520

acagauuauu uauaaaacag auugaaguaa ccuguuaacu ggcaaaaaga gaaugagauc 5580

ggauuuaaau guauggcagu aaguccuauu gaucccucca guuaucucag uaugacugca 5640

guauauucau ucacuaaaac cacucacuag auaccaacua cacaccuggc acugcagaug 5700

uaaaggucag ucacacaugu ucugacuuua cagaguucac aguagcagug gaggaugaua 5760

uauguggaaa caaaaaaggc auugauucua uucagagcac uguuagggcu caaaggagag 5820

aggggucuuu ccaccuaaga aaugaggaau agggucauca uagaagugac cuuaagucuu 5880

aaaaauuaag aaggggauuc caagcugcuu cagacagaga cacaucgagc uaaaacacag 5940

agguaugaaa gagcacaggg acuuuaggaa uugcacaguu cauucuaaca ggaacaaaag 6000

gcucaagggg ggcaagaaau gaggcuguau ggaaagagau ucaauguaag cacuuuauaa 6060

aauagauuaa uuucugauuc aaugaagcau uucuugauca uuguguacaa ggcacuacau 6120

gcaucaugga aaauucauua ggaugcauug ccagcacuuu gcagaacuga uauuauucag 6180

ccucaagcuu uccaguggcc aaagggaaau gcugacugcu uuucauauau uugagucaaa 6240

gauuuuuuau auggucaaug aagacuaaua uaagggcagu gggauuuuca cagaugcaug 6300

ccauguuguc gagagccucu uagauuuucu caacugugag aaagaaaaac gaaaauguug 6360

aagacguuga gucuggagag gggauacuaa ucacugucca guugggcacu ggugggaaug 6420

gggaaauggc acaggaaugc aagccucucc acccuacccc ccgaacucca gccauacacu 6480

caucguuuca caaaauauaa augaguuagc auuaaauguu ucagaguaaa uaauuccuuu 6540

ucccgaaaug caugaagaua gaguaacaga cuucucacac uguauuuuua ggguauggag 6600

aauuuagaag guuaaagaau uacugcuuca auuuuucagu uaaaaaaaaa ucaggaagcu 6660

cuguucauuc aggcuaugca ccaugugcac agucaagaau uagcagaaac ccucugcauu 6720

uacaaacacu uugugcuaua aaaaaguaau uuuuaaaaag ccacgugugu gugugguau 6780

auauauauau auauauauau uuaaagccaa gguuuugaua cuuuuuuaca aaaacuacaa 6840

gagaaaacaa auauaccugu ccaaaccaua uacuuuuaaa agagcauuuu uuuuuccaua 6900

caagcuguug uuaauuuggg gguaaagugc ugauuugcaa acuucaucaa auuguuccca 6960

aguggauucu ccuuguuugu cucccccuac caaccccaaa guuaccauau uugauguaag 7020

aaucaggcau guuagaaugu ugugucacac uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau 7080

ucaaguuccg uuagcuucug uacgcggugc ccuuugcagu cuggugucuc uuccagaggc 7140

gaggggcug aggaugggu gcugcaucuc acuagcuaua cuggcaucau cuugguaaac 7200

ugaaaaccaa auguggacau uuguaaaauc agugcacugu uucuagagag agauuaaauu 7260

cauuuaaaaa aaa 7273

<210> 14
<211> 793
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Met Gly Leu Pro Glu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln His Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Asp Pro Leu Leu Gly Gly Gln Gly Pro Ala Lys Asp Cys Glu
35 40 45

Lys Asp Gln Phe Gln Cys Arg Asn Glu Arg Cys Ile Pro Ser Val Trp
50 55 60

Arg Cys Asp Glu Asp Asp Asp Cys Leu Asp His Ser Asp Glu Asp Asp
65 70 75 80

Cys Pro Lys Lys Thr Cys Ala Asp Ser Asp Phe Thr Cys Asp Asn Gly
85 90 95

His Cys Ile His Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Glu Glu Cys Pro
100 105 110

Asp Gly Ser Asp Glu Ser Glu Ala Thr Cys Thr Lys Gln Val Cys Pro
115 120 125

Ala Glu Lys Leu Ser Cys Gly Pro Thr Ser His Lys Cys Val Pro Ala
130 135 140

```
Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Lys Asp Cys Glu Gly Gly Ala Asp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Gly Cys Ala Thr Trp Leu Asn Glu Cys Leu His Asn Asn Gly Gly
                165                 170                 175

Cys Ser His Ile Cys Thr Asp Leu Lys Ile Gly Phe Glu Cys Thr Cys
            180                 185                 190

Pro Ala Gly Phe Gln Leu Leu Asp Gln Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp
        195                 200                 205

Glu Cys Lys Asp Pro Asp Ala Cys Ser Gln Ile Cys Val Asn Tyr Lys
    210                 215                 220

Gly Tyr Phe Lys Cys Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Glu Met Asp Leu Leu
225                 230                 235                 240

Thr Lys Asn Cys Lys Ala Ala Ala Gly Lys Ser Pro Ser Leu Ile Phe
                245                 250                 255

Thr Asn Arg His Glu Val Arg Arg Ile Asp Leu Val Lys Arg Asn Tyr
            260                 265                 270

Ser Arg Leu Ile Pro Met Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Asp Val Glu
        275                 280                 285

Val Ala Thr Asn Arg Ile Tyr Trp Cys Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Ile
    290                 295                 300

Tyr Ser Ala Tyr Met Asp Lys Ala Ser Asp Pro Lys Glu Gln Glu Val
305                 310                 315                 320

Leu Ile Asp Glu Gln Leu His Ser Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp
                325                 330                 335

Val His Lys His Ile Tyr Trp Thr Asp Ser Gly Asn Lys Thr Ile Ser
            340                 345                 350

Val Ala Thr Val Asp Gly Gly Arg Arg Arg Thr Leu Phe Ser Arg Asn
        355                 360                 365

Leu Ser Glu Pro Arg Ala Ile Ala Val Asp Pro Leu Arg Gly Phe Met
    370                 375                 380

Tyr Trp Ser Asp Trp Gly Asp Gln Ala Lys Ile Glu Lys Ser Gly Leu
385                 390                 395                 400
```

```
Asn Gly Val Asp Arg Gln Thr Leu Val Ser Asp Asn Ile Glu Trp Pro
                405                 410                 415

Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Val Asp
            420                 425                 430

Ser Lys Leu His Gln Leu Ser Ser Ile Asp Phe Ser Gly Gly Asn Arg
        435                 440                 445

Lys Thr Leu Ile Ser Ser Thr Asp Phe Leu Ser His Pro Phe Gly Ile
    450                 455                 460

Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala
465                 470                 475                 480

Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala
                485                 490                 495

Glu Asn Leu Asn Asn Pro His Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys
            500                 505                 510

Gln Pro Arg Ala Pro Asp Ala Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly
        515                 520                 525

Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser
    530                 535                 540

Pro Lys Tyr Thr Cys Ala Cys Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp
545                 550                 555                 560

Met Lys Arg Cys Tyr Arg Ala Pro Gln Ser Thr Ser Thr Thr Thr Leu
                565                 570                 575

Ala Ser Thr Met Thr Arg Thr Val Pro Ala Thr Thr Arg Ala Pro Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Val His Arg Ser Thr Tyr Gln Asn His Ser Thr Glu Thr Pro
        595                 600                 605

Ser Leu Thr Ala Ala Val Pro Ser Ser Val Ser Val Pro Arg Ala Pro
    610                 615                 620

Ser Ile Ser Pro Ser Thr Leu Ser Pro Ala Thr Ser Asn His Ser Gln
625                 630                 635                 640

His Tyr Ala Asn Glu Asp Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala
                645                 650                 655
```

```
Val Ile Gly Ile Ile Val Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met
            660                 665                 670

Ser Gly Tyr Leu Ile Trp Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser
        675                 680                 685

Met Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Arg Lys Thr Thr Glu Glu Glu Asp
    690                 695                 700

Glu Asp Glu Leu His Ile Gly Arg Thr Ala Gln Ile Gly His Val Tyr
705                 710                 715                 720

Pro Ala Ala Ile Ser Ser Phe Asp Arg Pro Leu Trp Ala Glu Pro Cys
                725                 730                 735

Leu Gly Glu Thr Arg Glu Pro Glu Asp Pro Ala Pro Ala Leu Lys Glu
            740                 745                 750

Leu Phe Val Leu Pro Gly Glu Pro Arg Ser Gln Leu His Gln Leu Pro
        755                 760                 765

Lys Asn Pro Leu Ser Glu Leu Pro Val Val Lys Ser Lys Arg Val Ala
    770                 775                 780

Leu Ser Leu Glu Asp Asp Gly Leu Pro
785                 790
```

<210> 15
<211> 6994
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgccgccg       60

agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcggcggcg      120

gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga      180

cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug      240

ggccucccgg agccgggccc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug      300

cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa      360

gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucccc      420

ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc      480

cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa      540

cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu      600
```

ugcaccaagc aggugugucc ugcagagaag cugagcugug gacccaccag ccacaagugu 660

guaccugccu cguggcgcug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720

ggcugugcua ccucacuggg caccugccgu ggggacgagu uccagugugg ggaugggaca 780

uguguccuug caaucaagca cugcaaccag gagcaggacu guccagaugg gagugaugaa 840

gcuggcugcc uacaggggcu gaacgagugu cugcacaaca auggcggcug cucacacauc 900

ugcacugacc ucaagauugg cuuugaaugc acgugcccag caggcuucca gcuccuggac 960

cagaagaccu guggcgacau ugaugagugc aaggacccag augccugcag ccagaucugu 1020

gucaauuaca agggcuauuu uaagugugag ugcuacccug gcuacgagau ggaccuacug 1080

accaagaacu gcaaggcugc ugcuggcaag agcccauccc uaaucuucac caaccggcac 1140

gaggugcgga ggaucgaccu ggugaagcgg aacuauucac gccucauccc caugcucaag 1200

aaugucgugg cacuagaugu ggaaguugcc accaaucgca ucuacuggug ugaccucucc 1260

uaccguaaga ucuauagcgc cuacauggac aaggccagug acccgaaaga gcaggagguc 1320

cucauugacg agcaguugca cucuccagag ggccuggcag uggacugggu ccacaagcac 1380

aucuacugga cugacucggg caauaagacc aucucagugg ccacaguuga ugguggccgc 1440

cgacgcacuc ucuucagccg uaaccucagu gaaccccggg ccaucgcugu ugacccccug 1500

cgaggguuca uguauugguc ugacuggggg gaccaggcca agauugagaa aucugggcuc 1560

aacggugugg accggcaaac acugguguca gacaauauug aauggcccaa cggaaucacc 1620

cuggaucugc ugagccagcg cuuguacugg guagacucca agcuacacca acuguccagc 1680

auugacuuca guggaggcaa cagaaagacg cugaucuccu ccacugacuu ccugagccac 1740

ccuuuuggga uagcuguguu ugaggacaag guguucugga cagaccugga gaacgaggcc 1800

auuuucagug caaaucggcu caauggccug gaaaucucca uccuggcuga gaaccucaac 1860

aacccacaug acauugucau cuuccaugag cugaagcagc caagagcucc agaugccugu 1920

gagcugagug uccagccuaa uggaggcugu gaauaccugu gccuuccugc uccucagauc 1980

uccagccacu cucccaagua cacaugugcc uguccugaca caauguggcu ggguccagac 2040

augaagaggu gcuaccgaga ugcaaaugaa gacaguaaga ugggcucaac agucacugcc 2100

gcuguuaucg ggaucaucgu gcccauagug gugauagccc uccugugcau gaguggauac 2160

cugaucugga gaaacuggaa gcggaagaac accaaaagca ugaauuuuga caacccaguc 2220

uacaggaaaa caacagaaga agaagacgaa gaugagcucc auauagggag aacugcucag 2280

auuggccaug ucuauccugc acgaguggca uuaagccuug aagaugaugg acuacccuga 2340

ggaugggauc acccccuucg ugccucaugg aauucagucc caugcacuac acucuggaug 2400

guguaugacu ggaugaaugg guuucuauau augggucugu gugaguguau gugugugugu 2460

gauuuuuuuu uuaaauuuau guugcggaaa gguaaccaca aaguuaugau gaacugcaaa 2520

cauccaaagg augugagagu uuuucuaugu auaauguuuu auacacuuuu uaacugguug 2580

cacuacccau gaggaauucg uggaauggcu acugcugacu aacaugaugc acauaaccaa 2640

auggggggcca auggcacagu accuuacuca ucauuuaaaa acuauauuua cagaagaugu 2700

uugguugcug ggggggcuuu uuuagguuuu ggggcauuug uuuuuuguaa auaagaugau 2760

uaugcuuugu ggcuauccau caacauaagu aaaaaaaaaa aaaaaacacu ucaacucccu 2820

cccccauuua gauuauuuau uaacauauuu uaaaaaucag augaguucua uaaauaauuu 2880

agagaaguga gaguauuuau uuuuggcaug uuuggcccac cacacagacu cugugugugu 2940

augugugugu uuauaugugu auguguguga cagaaaaauc uguagagaag aggcacaucu 3000

auggcuacug uucaaauaca uaaagauaaa uuuauuuuca cacaguccac aagggguaua 3060

ucuuguaguu uucagaaaag ccuuuggaaa ucuggaucag aaaauagaua ccaugguuug 3120

ugcaauuaug uaguaaaaaa ggcaaaucuu uucaccucug gcuauuccug agaccccagg 3180

aagucaggaa aagccuuuca gcucacccau ggcugcugug acuccuacca gggcuuucuu 3240

ggcuuuggcg aaggucagug uacagacauu ccaugguacc agagugcuca gaaacucaag 3300

auaggauaug ccucacccuc agcuacuccu uguuuuaaag uucagcucuu ugaguaacuu 3360

cuucaauuuc uuucaggaca cuuggguuga auucaguaag uuuccucuga agcacccuga 3420

agggugccau ccuuacagag cuaaguggag acguuuccag aucagcccaa guuuacuaua 3480

gagacuggcc caggcacuga augucuagga caugcugugg augaagauaa agauggugga 3540

auagguuuua ucacaucucu uauuucucuu uuccccuuac ucucuaccau uuccuuuaug 3600

uggggaaaca uuuuaaggua auaaauaggu uacuuaccau cauauguuca uauagaugaa 3660

acuaauuuuu ggcuuaaguc agaacaacug gccaaaauug aagucauauu ugaggggggа 3720

aauggcauac gcaauauuau auuauauugg auauuuaugu ucacacagga auuugguuua 3780

cugcuuugua aauaaaagga aaaacuccgg guauauguau agauguucuu cauuauagac 3840

aucuucuuug cuuuucuugg ccuuggggga ggaagggaga agugcucuuu ucuacuugug 3900

gggucuccca uuggaaacau aauccuauag ucccagaagg auucaguccc caguggcuuu 3960

cccauccaaa gagaaagagu uugaguuucu uaacucugcu guucugccac uuacucccac 4020

uagacaacca gggacaaggu gcaacaugga aguguuugac uuaaguagga gcagaggagc 4080

ugcaucuaau cucaucauac cuggaacuug acacacuuaa gcaaaugccu ucccaucccu 4140

accugccaga ugccccccaac ucaaugaagu uggaugucuc accagcuuga uacccuuuga 4200

auuuucaguc agacauucug gaguucuagc auccuguacc uaggaccuuc cucuguguca 4260

cucuuggccu ccuaaacucu aagaaaauaa cuauauucug gagcuugggc aguguguuuu 4320

gcauaaucca gcaaucuccu caugacaugc auguguugau aguccugaaa cauucauuga 4380

gaggguaaau gcaguugacc uagaaugacc aauaccaaac agaauuuuaa gaacaggugg 4440

ccaacuccua uggagcuuac ucacauauua cuauucuuuu aagaacggaa aguaaaauua 4500

uuuuugacug aagaaaaaug augacaguga aaaacaugga aauguacuca aaacaaguga 4560

cuuuuucugu aaccuuccaa agaaacugaa uuuuccaagg aauuaaauga uaacaguggc 4620

uaaggcauag uuucuaaacu uucaguaaga uccuggcauu cacagaaaaa aaugaugaau 4680

ggggucugga cauacagccu gagaucucaa aaugacaaug aaauucacaa cuuuuucuca 4740

gagacauuca uguuuccugc auaugcuaca acugcaguuu gaaagaggca gcaaugggag 4800

caacccuuua caagaaacaa auugugauau auucaugugu uggacggcag uaaauaagau 4860

gaaaccugag gagucagauc caccuucccc cauucauaga ggcuuuucag ccucauuuug 4920

agguacaguu acauaucuuu ugccuuuugc ccccgugcau agcuaucuac agccaaucac 4980

agaucacaga gucacuggac uauagagcug gaaggaagcu cagagacaau gccaaggggg 5040

cagaaaauuu aucagaagcc agucccagug cguuuccucc auuuccuucu gcaggaagac 5100

uauuuugggc ugccugaaca uuguaucaaa ccugcuaccu auacuauggu cuaccuuucc 5160

uccaguggaa uuacaaaggc acuaacugaa augccuucua gaaacagaga aaacgaaacu 5220

guacuuauuu acucuugaua cacagauuau uuauaaaaca gauugaagua accuguuaac 5280

uggcaaaaag agaaugagau cggauuuaaa uguauggcag uaaguccuau ugaucccucc 5340

aguuaucuca guaugacugc aguauauuca uucacuaaaa ccacucacua gauaccaacu 5400

acacaccugg cacugcagau guaaagguca gucacacaug uucugacuuu acagaguuca 5460

caguagcagu ggaggaugau auauguggaa acaaaaaagg cauugauucu auucagagca 5520

cuguuagggc ucaaaggaga gaggggucuu uccaccuaag aaaugaggaa uagggucauc 5580

auagaaguga ccuuaagucu uaaaaauuaa gaaggggauu ccaagcugcu ucagacagag 5640

acacaucgag cuaaaacaca gagguaugaa agagcacagg gacuuuagga auugcacagu 5700

ucauucuaac aggaacaaaa ggcucaaggg gggcaagaaa ugaggcugua uggaaagaga 5760

uucaauguaa gcacuuuaua aaauagauua auuucugauu caaugaagca uuucuugauc 5820

auuguguaca aggcacuaca ugcaucaugg aaaauucauu aggaugcauu gccagcacuu 5880

ugcagaacug auauuauuca gccucaagcu uuccaguggc caaagggaaa ugcugacugc 5940

uuuucauaua uuugagucaa agauuuuuua uauggucaau gaagacuaau auaagggcag 6000

ugggauuuuc acagaugcau gccauguugu cgagagccuc uuagauuuuc ucaacuguga 6060

gaaagaaaaa cgaaaauguu gaagacguug agucuggaga ggggauacua aucacugucc 6120

aguugggcac ugguggggaau ggggaaaugg cacaggaaug caagccucuc cacccuaccc 6180

cccgaacucc agccauacac ucaucguuuc acaaaauaua aaugaguuag cauuaaaugu 6240

uucagaguaa auaauuccuu uucccgaaau gcaugaagau agaguaacag acuucucaca 6300

cuguauuuuu aggguaugga gaauuuagaa gguuaaagaa uuacugcuuc aauuuuucag 6360

uuaaaaaaaa aucaggaagc ucuguucauu caggcuaugc accaugugca cagucaagaa 6420

uuagcagaaa cccucugcau uuacaaacac uuugugcuau aaaaaaguaa uuuuuaaaaa 6480

gccacgugug ugugugugua uauauauaua uauauauaua uuuaaagcca agguuuugau 6540

acuuuuuuac aaaaacuaca agagaaaaca aauauaccug uccaaaccau auacuuuuaa 6600

aagagcauuu uuuuuuccau acaagcuguu guuaauuugg ggguaaagug cugauuugca 6660

aacuucauca aauuguuccc aaguggauuc uccuuguuug ucucccccua ccaaccccaa 6720

aguuaccaua uuugauguaa gaaucaggca uguuagaaug uugugucaca cuaacugauu 6780

cugcucuuuu ugucuuguca uucaaguucc guuagcuucu guacgcggug cccuuugcag 6840

ucuggugucu cuuccagagg cgaggggggcu gaggaugggg ugcugcaucu cacuagcuau 6900

acuggcauca ucuugguaaa cugaaaacca aauguggaca uuuguaaaau cagugcacug 6960

uuucuagaga gagauuaaau ucauuuaaaa aaaa 6994

<210> 16
<211> 700
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Gly Leu Pro Glu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln His Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Asp Pro Leu Leu Gly Gly Gln Gly Pro Ala Lys Asp Cys Glu
35 40 45

Lys Asp Gln Phe Gln Cys Arg Asn Glu Arg Cys Ile Pro Ser Val Trp
50 55 60

Arg Cys Asp Glu Asp Asp Asp Cys Leu Asp His Ser Asp Glu Asp Asp
65 70 75 80

Cys Pro Lys Lys Thr Cys Ala Asp Ser Asp Phe Thr Cys Asp Asn Gly
85 90 95

His Cys Ile His Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Glu Glu Cys Pro
100 105 110

Asp Gly Ser Asp Glu Ser Glu Ala Thr Cys Thr Lys Gln Val Cys Pro

```
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Leu Ser Cys Gly Pro Thr Ser His Lys Cys Val Pro Ala
    130                 135                 140

Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Lys Asp Cys Glu Gly Gly Ala Asp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Gly Cys Ala Thr Ser Leu Gly Thr Cys Arg Gly Asp Glu Phe Gln
                165                 170                 175

Cys Gly Asp Gly Thr Cys Val Leu Ala Ile Lys His Cys Asn Gln Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Gln Gly Leu
        195                 200                 205

Asn Glu Cys Leu His Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Thr Asp
    210                 215                 220

Leu Lys Ile Gly Phe Glu Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Gln Leu Leu
225                 230                 235                 240

Asp Gln Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Pro Asp Ala
                245                 250                 255

Cys Ser Gln Ile Cys Val Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Lys Cys Glu Cys
            260                 265                 270

Tyr Pro Gly Tyr Glu Met Asp Leu Leu Thr Lys Asn Cys Lys Ala Ala
        275                 280                 285

Ala Gly Lys Ser Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg
    290                 295                 300

Arg Ile Asp Leu Val Lys Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ile Pro Met Leu
305                 310                 315                 320

Lys Asn Val Val Ala Leu Asp Val Glu Val Ala Thr Asn Arg Ile Tyr
                325                 330                 335

Trp Cys Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Ala Tyr Met Asp Lys
            340                 345                 350

Ala Ser Asp Pro Lys Glu Gln Glu Val Leu Ile Asp Glu Gln Leu His
        355                 360                 365
```

```
Ser Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Lys His Ile Tyr Trp
    370                 375                 380

Thr Asp Ser Gly Asn Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Val Asp Gly Gly
385                 390                 395                 400

Arg Arg Arg Thr Leu Phe Ser Arg Asn Leu Ser Glu Pro Arg Ala Ile
                405                 410                 415

Ala Val Asp Pro Leu Arg Gly Phe Met Tyr Trp Ser Asp Trp Gly Asp
            420                 425                 430

Gln Ala Lys Ile Glu Lys Ser Gly Leu Asn Gly Val Asp Arg Gln Thr
        435                 440                 445

Leu Val Ser Asp Asn Ile Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu
    450                 455                 460

Leu Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Gln Leu Ser
465                 470                 475                 480

Ser Ile Asp Phe Ser Gly Gly Asn Arg Lys Thr Leu Ile Ser Ser Thr
                485                 490                 495

Asp Phe Leu Ser His Pro Phe Gly Ile Ala Val Phe Glu Asp Lys Val
            500                 505                 510

Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu
        515                 520                 525

Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala Glu Asn Leu Asn Asn Pro His
    530                 535                 540

Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys Gln Pro Arg Ala Pro Asp Ala
545                 550                 555                 560

Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu
                565                 570                 575

Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ala Cys
            580                 585                 590

Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp Met Lys Arg Cys Tyr Arg Asp
        595                 600                 605

Ala Asn Glu Asp Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala Val Ile
    610                 615                 620
```

```
Gly Ile Ile Val Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met Ser Gly
625                 630                 635                 640

Tyr Leu Ile Trp Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser Met Asn
                645                 650                 655

Phe Asp Asn Pro Val Tyr Arg Lys Thr Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp
            660                 665                 670

Glu Leu His Ile Gly Arg Thr Ala Gln Ile Gly His Val Tyr Pro Ala
        675                 680                 685

Arg Val Ala Leu Ser Leu Glu Asp Asp Gly Leu Pro
    690                 695                 700
```

<210> 17
<211> 7606
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

```
gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgccgccg        60

agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcggcggcg       120

gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga       180

cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug       240

ggccucccCg agccgggccc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug       300

cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa       360

gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucccc       420

ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc       480

cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa       540

cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu       600

ugcaccaagc aggugugucc ugcagagaag cugagcugug gacccaccag ccacaagugu       660

guaccugccu cguggcgcug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc       720

ggcugugcua ccuugugcgc cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc       780

gccguguucg ugugcgacgg cgacgacgac uguggugacg gcagcgauga gcgcggcugu       840

gcagacccgg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcggcg gcgauggcgg cggcgccugc       900

aucccggagc gcugggucug cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca       960

gccgagcucu gcggccgucc gggccccggg gccacguccg cgcccgccgc cugcgccacc      1020

gccucccagu ucgccugccg cagcggcgag ugcgugcacc ugggcuggcg cugcgacggc      1080
```

gaccgcgacu gcaaagacaa aucggacgag gccgacugcc cacugggcac cugccguggg 1140

gacgaguucc aguguggggа ugggacaugu guccuugcaa ucaagcacug caaccaggag 1200

caggacuguc cagaugggag ugaugaagcu ggcugccuac aggggcugaa cgagugucug 1260

cacaacaaug gcggcugcuc acacaucugc acugaccuca agauuggcuu ugaaugcacg 1320

ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag 1380

gacccagaug ccugcagcca gaucuguguc aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc 1440

uacccuggcu acgagaugga ccuacugacc aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc 1500

ccaucccuaa ucuucaccaa ccggcacgag gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac 1560

uauucacgcc ucaucccсau gcucaagaau gucguggcac uagaugugga aguugccacc 1620

aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac cguaagaucu auagcgccua cauggacaag 1680

gccagugacc cgaaagagca ggagguccuc auugacgagc aguugcacuc uccagagggc 1740

cuggcagugg acugggucca caagcacauc uacuggacug acucgggcaa uaagaccauc 1800

ucaguggcca caguugaugg uggccgccga cgcacucucu ucagccguaa ccucagugaa 1860

ccccgggcca ucgcuguuga cccccugcga ggguucaugu auuggucuga cuggggggac 1920

caggccaaga uugagaaauc ugggcucaac gguguggacc ggcaaacacu ggugucagac 1980

aauauugaau ggcccaacgg aaucacccug gaucugcuga gccagcgcuu guacugggua 2040

gacuccaagc uacaccaacu guccagcauu gacuucagug gaggcaacag aaagacgcug 2100

aucuccucca cugacuuccu gagccacccu uuugggauag cuguguuuga ggacaaggug 2160

uucuggacag accuggagaa cgaggccauu uucagugcaa aucggcucaa uggccuggaa 2220

aucuccaucc uggcugagaa ccucaacaac ccacaugaca uugucaucuu ccaugagcug 2280

aagcagccaa gagcuccaga ugccugugag cugagugucc agccuaaugg aggcugugaa 2340

uaccugugcc uuccugcucc ucagaucucc agccacucuc ccaaguacac augugccugu 2400

ccugacacaa uguggcuggg uccagacaug aagaggugcu accgagcacc ucaaucuacc 2460

ucaacuacga cguuagcuuc uaccaugacg aggacaguac cugccaccac aagagccccc 2520

gggaccaccg uccacagauc caccuaccag aaccacagca cagagacacc aagccugaca 2580

gcugcagucc caagcucagu uaguguccсc agggcuccca gcaucagccc gucuacccua 2640

agcccugcaa ccagcaacca cucccagcac uaugcaaaug aagacaguaa gaugggcuca 2700

acagucacug ccgcuguuau cgggaucauc gugcccauag uggugauagc ccuccugugc 2760

augaguggau accugaucug gagaaacugg aagcggaaga acaccaaaag caugaauuuu 2820

gacaacccag ucuacaggaa aacaacagaa gaagaagacg aagaugagcu ccauauaggg 2880

agaacugcuc agauuggcca ugucuauccu gcacgagugg cauuaagccu ugaagaugau 2940

ggacuacccu gaggauggga ucacccccuu cgugccucau ggaauucagu cccaugcacu 3000

acacucugga ugguguauga cuggaugaau ggguuucuau auaugggucu gugugagugu 3060

augugugugu gugauuuuuu uuuuaaauuu auguugcgga aagguaacca caaaguuaug 3120

augaacugca aacauccaaa ggaugugaga guuuuucuau guauaauguu uuauacacuu 3180

uuuaacuggu ugcacuaccc augaggaauu cguggaaugg cuacugcuga cuaacaugau 3240

gcacauaacc aaaugggggc caauggcaca guaccuuacu caucauuuaa aaacuauauu 3300

uacagaagau guuugguugc ugggggggcu uuuuuagguu uuggggcauu uguuuuuugu 3360

aaauaagaug auuaugcuuu guggcuaucc aucaacauaa guaaaaaaaa aaaaaaaaca 3420

cuucaacucc cucccccauu uagauuauuu auuaacauau uuuaaaaauc agaugaguuc 3480

uauaaauaau uuagagaagu gagaguauuu auuuuuggca uguuuggccc accacacaga 3540

cucugugugu guaugugugu guuuauaugu guaugugugu gacagaaaaa ucuguagaga 3600

agaggcacau cuauggcuac uguucaaaua cauaaagaua aauuuauuuu cacacagucc 3660

acaaggggua uaucuuguag uuuucagaaa agccuuugga aaucuggauc agaaaauaga 3720

uaccaugguu ugugcaauua uguaguaaaa aaggcaaauc uuuucaccuc uggcuauucc 3780

ugagacccca ggaagucagg aaaagccuuu cagcucaccc auggcugcug ugacuccuac 3840

cagggcuuuc uuggcuuugg cgaaggucag uguacagaca uuccauggua ccagagugcu 3900

cagaaacuca agauaggaua ugccucaccc ucagcuacuc cuuguuuuaa aguucagcuc 3960

uuugaguaac uucuucaauu ucuuucagga cacuuggguu gaauucagua aguuuccucu 4020

gaagcacccu gaagggugcc auccuuacag agcuaagugg agacguuucc agaucagccc 4080

aaguuuacua uagagacugg cccaggcacu gaaugucuag gacaugcugu ggaugaagau 4140

aaagauggug gaauagguuu uaucacaucu cuuauuucuc uuuucccuu acucucuacc 4200

auuuccuuua uguggggaaa cauuuuaagg uaauaaauag guuacuuacc aucauauguu 4260

cauauagaug aaacuaauuu uuggcuuaag ucagaacaac uggccaaaau ugaagucaua 4320

uuugaggggg gaaauggcau acgcaauauu auauuauauu ggauauuuau guucacacag 4380

gaauuugguu uacugcuuug uaaauaaaag gaaaaacucc ggguauaugu auagauguuc 4440

uucauuauag acaucuucuu ugcuuuucuu ggccuuuggg gaggaaggga gaagugcucu 4500

uuucuacuug ugggguucucc cauuggaaac auaauccuau agucccagaa ggauucaguc 4560

cccaguggcu uucccaucca aagagaaaga guuugaguuu cuuaacucug cuguucugcc 4620

acuuacuccc acuagacaac cagggacaag gugcaacaug gaaguguuug acuuaaguag 4680

gagcagagga gcugcaucua aucucaucau accuggaacu ugacacacuu aagcaaaugc 4740

cuucccaucc cuaccugcca gaugccccca acucaaugaa guuggauguc ucaccagcuu 4800

gauacccuuu gaauuuucag ucagacauuc uggaguucua gcauccugua ccuaggaccu 4860

uccucugugu cacucuuggc cuccuaaacu cuaagaaaau aacuauauuc uggagcuugg 4920

gcaguguguu uugcauaauc cagcaaucuc cucaugacau gcauguguug auaguccuga 4980

aacauucauu gagaggguaa augcaguuga ccuagaauga ccaauaccaa acagaauuuu 5040

aagaacaggu ggccaacucc uauggagcuu acucacauau uacuauucuu uuaagaacgg 5100

aaaguaaaau uauuuuugac ugaagaaaaa ugaugacagu gaaaaacaug gaaauguacu 5160

caaaacaagu gacuuuuucu guaaccuucc aaagaaacug aauuuuccaa ggaauuaaau 5220

gauaacagug gcuaaggcau aguuucuaaa cuuucaguaa gauccuggca uucacagaaa 5280

aaaaugauga auggggucug gacauacagc cugagaucuc aaaaugacaa ugaaauucac 5340

aacuuuuucu cagagacauu cauguuuccu gcauaugcua caacugcagu uugaaagagg 5400

cagcaauggg agcaacccuu uacaagaaac aaauugugau auauucaugu guuggacggc 5460

aguaaauaag augaaaccug aggagucaga uccaccuucc cccauucaua gaggcuuuuc 5520

agccucauuu ugagguacag uuacauaucu uuugccuuuu gcccccgugc auagcuaucu 5580

acagccaauc acagaucaca gagucacugg acuauagagc uggaaggaag cucagagaca 5640

augccaaggg ggcagaaaau uuaucagaag ccagucccag ugcguuuccu ccauuuccuu 5700

cugcaggaag acuauuuugg gcugccugaa cauuguauca aaccugcuac cuauacuaug 5760

gucuaccuuu ccuccagugg aauuacaaag gcacuaacug aaaugccuuc uagaaacaga 5820

gaaaacgaaa cuguacuuau uuacucuuga uacacagauu auuuauaaaa cagauugaag 5880

uaaccuguua acuggcaaaa agagaaugag aucggauuua aauguauggc aguaaguccu 5940

auugaucccu ccaguuaucu caguaugacu gcaguauauu cauucacuaa aaccacucac 6000

uagauaccaa cuacacaccu ggcacugcag auguaaaggu cagucacaca uguucugacu 6060

uuacagaguu cacaguagca guggaggaug auauaugugg aaacaaaaaa ggcauugauu 6120

cuauucagag cacuguuagg gcucaaagga gagagggguc uuuccaccua agaaaugagg 6180

aauaggguca ucauagaagu gaccuuaagu cuuaaaaauu aagaagggga uuccaagcug 6240

cuucagacag agacacaucg agcuaaaaca cagagguaug aaagagcaca gggacuuuag 6300

gaauugcaca guucauucua acaggaacaa aaggcucaag gggggcaaga aaugaggcug 6360

uauggaaaga gauucaaugu aagcacuuua uaaaauagau uaauuucuga uucaaugaag 6420

cauuucuuga ucauugugua caaggcacua caugcaucau ggaaaauuca uuaggaugca 6480

uugccagcac uuugcagaac ugauauuauu cagccucaag cuuuccagug gccaaaggga 6540

aaugcugacu gcuuuucaua uauuugaguc aaagauuuuu uauaugguca augaagacua 6600

auauaagggc agugggauuu ucacagaugc augccauguu gucgagagcc ucuuagauuu 6660

ucucaacugu gagaaagaaa aacgaaaaug uugaagacgu ugagucugga gaggggauac 6720

uaaucacugu ccaguugggc acugguggga auggggaaau ggcacaggaa ugcaagccuc 6780

uccacccuac cccccgaacu ccagccauac acucaucguu ucacaaaaua uaaaugaguu 6840

agcauuaaau guuucagagu aaauaauucc uuuuccccgaa augcaugaag auagaguaac 6900

agacuucuca cacuguauuu uuaggguaug gagaauuuag aagguuaaag aauuacugcu 6960

ucaauuuuuc aguuaaaaaa aaaucaggaa gcucuguuca uucaggcuau gcaccaugug 7020

cacagucaag aauuagcaga aacccucugc auuuacaaac acuuugugcu auaaaaaagu 7080

aauuuuuaaa aagccacgug ugugugugug uauauauaua uauauauaua uauuuaaagc 7140

caagguuuug auacuuuuuu acaaaaacua caagagaaaa caaauauacc uguccaaacc 7200

auauacuuuu aaaagagcau uuuuuuuucc auacaagcug uuguuaauuu ggggguaaag 7260

ugcugauuug caaacuucau caaauuguuc ccaaguggau ucuccuuguu ugucucccccc 7320

uaccaacccc aaaguuacca uauuugaugu aagaaucagg cauguuagaa uguuguguca 7380

cacuaacuga uucugcucuu uuugucuugu cauucaaguu ccguuagcuu cuguacgcgg 7440

ugcccuuugc agucuggugu cucuuccaga ggcgaggggg cugaggaugg ggugcugcau 7500

cucacuagcu auacuggcau caucuuggua aacugaaaac caaaugugga cauuuguaaa 7560

aucagugcac uguuucuaga gagagauuaa auucauuuaa aaaaaa 7606

<210> 18
<211> 904
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Gly Leu Pro Glu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln His Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Asp Pro Leu Leu Gly Gly Gln Gly Pro Ala Lys Asp Cys Glu
35 40 45

Lys Asp Gln Phe Gln Cys Arg Asn Glu Arg Cys Ile Pro Ser Val Trp
50 55 60

Arg Cys Asp Glu Asp Asp Asp Cys Leu Asp His Ser Asp Glu Asp Asp
65 70 75 80

Cys Pro Lys Lys Thr Cys Ala Asp Ser Asp Phe Thr Cys Asp Asn Gly
85 90 95

His Cys Ile His Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Glu Glu Cys Pro
100 105 110

```
Asp Gly Ser Asp Glu Ser Glu Ala Thr Cys Thr Lys Gln Val Cys Pro
        115                 120                 125

Ala Glu Lys Leu Ser Cys Gly Pro Thr Ser His Lys Cys Val Pro Ala
    130                 135                 140

Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Lys Asp Cys Glu Gly Gly Ala Asp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Gly Cys Ala Thr Leu Cys Ala Pro His Glu Phe Gln Cys Gly Asn
                165                 170                 175

Arg Ser Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys
            180                 185                 190

Gly Asp Gly Ser Asp Glu Arg Gly Cys Ala Asp Pro Ala Cys Gly Pro
        195                 200                 205

Arg Glu Phe Arg Cys Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ala Cys Ile Pro Glu
    210                 215                 220

Arg Trp Val Cys Asp Arg Gln Phe Asp Cys Glu Asp Arg Ser Asp Glu
225                 230                 235                 240

Ala Ala Glu Leu Cys Gly Arg Pro Gly Pro Gly Ala Thr Ser Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Ala Cys Ala Thr Ala Ser Gln Phe Ala Cys Arg Ser Gly Glu Cys
            260                 265                 270

Val His Leu Gly Trp Arg Cys Asp Gly Asp Arg Asp Cys Lys Asp Lys
        275                 280                 285

Ser Asp Glu Ala Asp Cys Pro Leu Gly Thr Cys Arg Gly Asp Glu Phe
    290                 295                 300

Gln Cys Gly Asp Gly Thr Cys Val Leu Ala Ile Lys His Cys Asn Gln
305                 310                 315                 320

Glu Gln Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Gln Gly
                325                 330                 335

Leu Asn Glu Cys Leu His Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Thr
            340                 345                 350

Asp Leu Lys Ile Gly Phe Glu Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Gln Leu
```

```
        355                 360                 365

Leu Asp Gln Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Pro Asp
    370                 375                 380

Ala Cys Ser Gln Ile Cys Val Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Lys Cys Glu
385                 390                 395                 400

Cys Tyr Pro Gly Tyr Glu Met Asp Leu Leu Thr Lys Asn Cys Lys Ala
                405                 410                 415

Ala Ala Gly Lys Ser Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg His Glu Val
            420                 425                 430

Arg Arg Ile Asp Leu Val Lys Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ile Pro Met
        435                 440                 445

Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Asp Val Glu Val Ala Thr Asn Arg Ile
    450                 455                 460

Tyr Trp Cys Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Ala Tyr Met Asp
465                 470                 475                 480

Lys Ala Ser Asp Pro Lys Glu Gln Glu Val Leu Ile Asp Glu Gln Leu
                485                 490                 495

His Ser Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Lys His Ile Tyr
            500                 505                 510

Trp Thr Asp Ser Gly Asn Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Val Asp Gly
        515                 520                 525

Gly Arg Arg Arg Thr Leu Phe Ser Arg Asn Leu Ser Glu Pro Arg Ala
    530                 535                 540

Ile Ala Val Asp Pro Leu Arg Gly Phe Met Tyr Trp Ser Asp Trp Gly
545                 550                 555                 560

Asp Gln Ala Lys Ile Glu Lys Ser Gly Leu Asn Gly Val Asp Arg Gln
                565                 570                 575

Thr Leu Val Ser Asp Asn Ile Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp
            580                 585                 590

Leu Leu Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Gln Leu
        595                 600                 605
```

```
Ser Ser Ile Asp Phe Ser Gly Gly Asn Arg Lys Thr Leu Ile Ser Ser
    610                 615                 620

Thr Asp Phe Leu Ser His Pro Phe Gly Ile Ala Val Phe Glu Asp Lys
625                 630                 635                 640

Val Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg
                645                 650                 655

Leu Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala Glu Asn Leu Asn Asn Pro
            660                 665                 670

His Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys Gln Pro Arg Ala Pro Asp
        675                 680                 685

Ala Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys
    690                 695                 700

Leu Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ala
705                 710                 715                 720

Cys Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp Met Lys Arg Cys Tyr Arg
                725                 730                 735

Ala Pro Gln Ser Thr Ser Thr Thr Thr Leu Ala Ser Thr Met Thr Arg
            740                 745                 750

Thr Val Pro Ala Thr Thr Arg Ala Pro Gly Thr Thr Val His Arg Ser
        755                 760                 765

Thr Tyr Gln Asn His Ser Thr Glu Thr Pro Ser Leu Thr Ala Ala Val
    770                 775                 780

Pro Ser Ser Val Ser Val Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Pro Ser Thr
785                 790                 795                 800

Leu Ser Pro Ala Thr Ser Asn His Ser Gln His Tyr Ala Asn Glu Asp
                805                 810                 815

Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala Val Ile Gly Ile Ile Val
            820                 825                 830

Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met Ser Gly Tyr Leu Ile Trp
        835                 840                 845

Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser Met Asn Phe Asp Asn Pro
    850                 855                 860
```

```
Val Tyr Arg Lys Thr Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Leu His Ile
865                 870                 875                 880

Gly Arg Thr Ala Gln Ile Gly His Val Tyr Pro Ala Arg Val Ala Leu
                885                 890                 895

Ser Leu Glu Asp Asp Gly Leu Pro
            900
```

<210> 19
<211> 2358
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

```
aaacucacac aacaacucuu ccccgcugag aggagacagc cagugcgacu ccacccucca      60

gcucgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gucccggucc     120

ccaccuccga ccaccgccag cgcuccaggc cccgccgcuc cccgcucgcc gccaccgcgc     180

ccuccgcucc gcccgcagug ccaaccauga ccgccgccag uaugggcccc guccgcgucg     240

ccuucguggu ccuccucgcc cucugcagcc ggccggccgu cggccagaac ugcagcgggc     300

cgugccggug cccggacgag ccggcgccgc gcugcccggc gggcgugagc cucgugcugg     360

acggcugcgg cugcugccgc gucugcgcca agcagcuggg cgagcugugc accgagcgcg     420

accccugcga cccgcacaag ggccucuucu gugacuucgg cucccccggcc aaccgcaaga     480

ucggcgugug caccgccaaa gauggugcuc ccugcaucuu cgguggguacg guguaccgca     540

gcggagaguc cuuccagagc agcugcaagu accagugcac gugccuggac ggggcggugg     600

gcugcaugcc ccugugcagc auggacguuc gucugcccag cccugacugc cccuuccccga     660

ggagggucaa gcugcccggg aaaugcugcg aggagugggu gugugacgag cccaaggacc     720

aaaccguggu ugggccugcc cucgcggcuu accgacugga agacacguuu ggcccagacc     780

caacuaugau uagagccaac ugccuggucc agaccacaga guggagcgcc uguuccaaga     840

ccugugggau gggcaucucc acccggguua ccaaugacaa cgccuccugc aggcuagaga     900

agcagagccg ccugugcaug gucaggccuu gcgaagcuga ccuggaagag aacauuaaga     960

agggcaaaaa gugcauccgu acucccaaaa ucuccaagcc uaucaaguuu gagcuuucug    1020

gcugcaccag caugaagaca uaccgagcua aauucugugg aguauguacc gacggccgau    1080

gcugcacccc ccacagaacc accacccugc cgguggaguu caagugcccu gacggcgagg    1140

ucaugaagaa gaacaugaug uucaucaaga ccugugccug ccauuacaac ugucccggag    1200

acaaugacau cuuugaaucg cuguacuaca ggaagaugua cggagacaug gcaugaagcc    1260

agagagugag agacauuaac ucauuagacu ggaacuugaa cugauucaca ucucauuuuu    1320
```

ccguaaaaau gauuucagua gcacaaguua uuuaaaucug uuuuucuaac ugggggaaaa 1380

gauucccacc caauucaaaa cauugugcca ugucaaacaa auagucuauc aaccccagac 1440

acugguuuga agaauguuaa gacuugacag uggaacuaca uuaguacaca gcaccagaau 1500

guauauuaag guguggcuuu aggagcagug ggaggguacc agcagaaagg uuaguaucau 1560

cagauagcau cuuauacgag uaauaugccu gcuauuugaa guguaauuga gaaggaaaau 1620

uuuagcgugc ucacugaccu gccuguagcc ccagugacag cuaggaugug cauucuccag 1680

ccaucaagag acugagucaa guuguuccuu aagucagaac agcagacuca gcucugacau 1740

ucugauucga augacacugu ucaggaaucg gaauccuguc gauuagacug gacagcuugu 1800

ggcaagugaa uuugccugua acaagccaga uuuuuuaaaa uuuauauugu aaauauugug 1860

ugugugugug ugugguguaua uauauauaua uguacaguua ucuaaguuaa uuuaaaguug 1920

uuugugccuu uuuauuuuug uuuuuaaugc uuugauauuu caauguuagc cucaauuucu 1980

gaacaccaua gguagaaugu aaagcuuguc ugaucguuca aagcaugaaa uggauacuua 2040

uauggaaauu cugcucagau agaaugacag uccgucaaaa cagauuguuu gcaaagggga 2100

ggcaucagug uccuuggcag gcugauuucu agguaggaaa ugugguagcc ucacuuuuaa 2160

ugaacaaaug gccuuuauua aaaacugagu gacucuauau agcugaucag uuuuuucacc 2220

uggaagcauu uguuucuacu uugauaugac uguuuuucgg acaguuuauu uguugagagu 2280

gugaccaaaa guuacauguu ugcaccuuuc uaguugaaaa uaaaguguau auuuuuucua 2340

uaaaaaaaaa aaaaaaaa 2358

<210> 20
<211> 349
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Met	Thr	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Pro	Val	Arg	Val	Ala	Phe	Val	Val	Leu
1				5				10					15		
Leu	Ala	Leu	Cys	Ser	Arg	Pro	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro
			20					25				30			
Cys	Arg	Cys	Pro	Asp	Glu	Pro	Ala	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Ser
		35					40					45			
Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Ala	Lys	Gln	Leu
	50					55					60				
Gly	Glu	Leu	Cys	Thr	Glu	Arg	Asp	Pro	Cys	Asp	Pro	His	Lys	Gly	Leu
65					70					75					80

```
Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
            100                 105                 110

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
        115                 120                 125

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
    130                 135                 140

Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
145                 150                 155                 160

Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly
                165                 170                 175

Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
            180                 185                 190

Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
        195                 200                 205

Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
    210                 215                 220

Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
225                 230                 235                 240

Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys
                245                 250                 255

Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly
            260                 265                 270

Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr
        275                 280                 285

Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu
    290                 295                 300

Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile
305                 310                 315                 320

Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe
                325                 330                 335
```

Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
340 345

<210> 21
<211> 1939
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

aggaaggagg gguggccuga ccccucggca gucccucccc ucagccuuuc cccaaauugc 60

uacuucucug gggcuccagg uccugcuugu gcucagcucc agcucacugg cuggccaccg 120

agacuucugg acaggaaacu gcaccauccu cuucucccag caaggggcu ccagagacug 180

cccacccagg aagucuggug gccuggggau uuggacagug ccuugguaau gaccagggcu 240

ccaggaagag auguccuugu ggcugggggc cccugugccu gacauuccuc cugacucugc 300

gguggagcug uggaagccag gcgcacagga ugcaagcagc caggcccagg gaggcagcag 360

cugcauccuc agagaggaag ccaggaugcc ccacucugcu ggggguacug cagggguggg 420

gcuggaggcu gcagagccca cagcccugcu caccagggca gagcccccuu cagaacccac 480

agagauccgu ccacaaaagc ggaaaaaggg gccagccccc aaaaugcugg ggaacgagcu 540

augcagcgug uguggggaca aggccucggg cuuccacuac aauguucuga gcugcgaggg 600

cugcaaggga uucuuccgcc gcagcgucau caagggagcg cacuacaucu gccacagugg 660

cggccacugc cccauggaca ccuacaugcg ucgcaagugc caggaguguc ggcuucgcaa 720

augccgucag gcuggcaugc gggaggagug uguccuguca gaagaacaga uccgccugaa 780

gaaacugaag cggcaagagg aggaacaggc ucaugccaca uccuugcccc ccagggcuuc 840

cucacccccc caaauccugc cccagcucag cccggaacaa cugggcauga ucgagaagcu 900

cgucgcugcc cagcaacagu guaaccggcg cuccuuuucu gaccggcuuc gagucacgcc 960

uuggcccaug gcaccagauc cccauagccg ggaggcccgu cagcagcgcu uugcccacuu 1020

cacugagcug gccaucgucu cugugcagga gauaguugac uuugcuaaac agcuacccgg 1080

cuuccugcag cucagccggg aggaccagau ugcccugcug aagaccucug cgaucgaggu 1140

gaugcuucug gagacaucuc ggagguacaa cccugggagu gagaguauca ccuuccucaa 1200

ggauuucagu uauaaccggg aagacuuugc caaagcaggg cugcaagugg aauucaucaa 1260

ccccaucuuc gaguucucca gggccaugaa ugagcugcaa cucaaugaug ccgaguuugc 1320

cuugcucauu gcuaucagca ucuucucugc agaccggccc aacgugcagg accagcucca 1380

gguagagagg cugcagcaca cauaugugga agcccugcau gccuacgucu ccauccacca 1440

uccccaugac cgacugaugu ucccacggau gcuaaugaaa cuggugagcc uccggacccu 1500

gagcagcguc cacucagagc aaguguuugc acugcgucug caggacaaaa agcucccacc 1560

gcugcucucu gagaucuggg augugcacga augacuguuc ugucccaua uuuucuguuu 1620

ucuuggccgg auggcugagg ccugguggcu gccuccuaga aguggaacag acugagaagg 1680

gcaaacauuc cugggagcug ggcaaggaga uccucccgug gcauuaaaag agagucaaag 1740

gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga 1800

agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cuggggggcca cuuugcacag gguucuccag 1860

agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuccc acagggcccc aagaaaaauu 1920

cuccacuguc aaaaaaaaa 1939

<210> 22
<211> 447
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala
20 25 30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His
35 40 45

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr
50 55 60

Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
65 70 75 80

Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu
85 90 95

Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val
100 105 110

Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys
115 120 125

Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr
130 135 140

Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln
145 150 155 160

```
Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu
                165                 170                 175

Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu
            180                 185                 190

Pro Pro Arg Ala Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys
    210                 215                 220

Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met
225                 230                 235                 240

Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His
                245                 250                 255

Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala
            260                 265                 270

Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala
        275                 280                 285

Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg
    290                 295                 300

Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser
305                 310                 315                 320

Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile
                325                 330                 335

Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn
            340                 345                 350

Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp
        355                 360                 365

Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr
    370                 375                 380

Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp
385                 390                 395                 400

Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr
                405                 410                 415
```

Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp
420 425 430

Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
435 440 445

<210> 23
<211> 1759
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

aggaaggagg gguggccuga ccccucggca gucccucccc ucagccuuuc cccaaauugc 60

uacuucucug gggcuccagg uccugcuugu gcucagcucc agcucacugg cuggccaccg 120

agacuucugg acaggaaacu gcaccauccu cuucucccag caaggggcu ccagagacug 180

cccacccagg aagucuggug gccuggggau uuggacagug ccuugguaau gaccagggcu 240

ccaggaagag auguccuugu ggcuggggc cccugugccu gacauuccuc cugacucugc 300

gguggagcug uggaagccag gcgcacagga ugcaagcagc caggcccagg gaggcagcag 360

cugcauccuc agagaggaag ccaggaugcc ccacucugcu ggggguacug cagggguggg 420

gcuggaggcu gcagagccca cagcccugcu caccagggca gagcccccuu cagaacccac 480

agagauccgu ccacaaaagc ggaaaaaggg gccagccccc aaaaugcugg ggaacgagcu 540

augcagcgug uguggggaca aggccucggg cuuccacuac aauguucuga gcugcgaggg 600

cugcaaggga uucuuccgcc gcagcgucau caagggagcg cacuacaucu gccacagugg 660

cggccacugc cccauggaca ccuacaugcg ucgcaagugc caggaguguc ggcuucgcaa 720

augccgucag gcuggcaugc gggaggagug uguccuguca gaagaacaga uccgccugaa 780

gaaacugaag cggcaagagg aggaacaggc ucaugccaca uccuugcccc ccagggcuuc 840

cucacccccc caaauccugc cccagcucag cccggaacaa cugggcauga ucgagaagcu 900

cgucgcugcc cagcaacagu guaaccggcg cuccuuuucu gaccggcuuc gagucacggu 960

gaugcuucug gagacaucuc ggagguacaa cccugggagu gagaguauca ccuuccucaa 1020

ggauuucagu uauaaccggg aagacuuugc caaagcaggg cugcaagugg aauucaucaa 1080

ccccaucuuc gaguucucca gggccaugaa ugagcugcaa cucaaugaug ccgaguuugc 1140

cuugcucauu gcuaucagca ucuucucugc agaccggccc aacgugcagg accagcucca 1200

gguagagagg cugcagcaca cauaugugga agcccugcau gccuacgucu ccauccacca 1260

uccccaugac cgacugaugu ucccacggau gcuaaugaaa cuggugagcc uccggacccu 1320

gagcagcguc cacucagagc aaguguuugc acugcgucug caggacaaaa agcucccacc 1380

gcugcucucu gagaucuggg augugcacga augacuguuc ugucccccaua uuuucuguuu 1440

ucuuggccgg auggcugagg ccugguggcu gccuccuaga aguggaacag acugagaagg 1500

gcaaacauuc cugggagcug ggcaaggaga uccucccgug gcauuaaaag agagucaaag 1560

gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga 1620

agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cuggggggcca cuuugcacag gguucuccag 1680

agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuccc acagggcccc aagaaaaauu 1740

cuccacuguc aaaaaaaaa 1759

<210> 24
<211> 387
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala
20 25 30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His
35 40 45

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr
50 55 60

Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
65 70 75 80

Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu
85 90 95

Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val
100 105 110

Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys
115 120 125

Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr
130 135 140

Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln
145 150 155 160

Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu
165 170 175

```
Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu
            180                 185                 190

Pro Pro Arg Ala Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys
    210                 215                 220

Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Val Met Leu Leu
225                 230                 235                 240

Glu Thr Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu
                245                 250                 255

Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln
            260                 265                 270

Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu
        275                 280                 285

Leu Gln Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile
    290                 295                 300

Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg
305                 310                 315                 320

Leu Gln His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His
                325                 330                 335

His Pro His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val
            340                 345                 350

Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu
        355                 360                 365

Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp
    370                 375                 380

Val His Glu
385
```

<210> 25
<211> 1748
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

aucuuacuua gggaccugcu ggggugcggg gaaaaggcgc agucucggug ggauugcgug 60

caggaggguc guggucuggc uguggcggag gagcauaaga agacucugcg guggagcugu 120

ggaagccagg cgcacaggau gcaagcagcc aggcccaggg aggcagcagc ugcauccuca 180

gagaggaagc caggaugccc cacucugcug gggguacugc aggggugggg cuggaggcug 240

cagagcccac agcccugcuc accagggcag agcccccuuc agaacccaca gagauccguc 300

cacaaaagcg gaaaaagggg ccagccccca aaaugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu 360

gugggacaa ggccucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau 420

ucuuccgccg cagcgucauc aagggagcgc acuacaucug ccacaguggc ggccacugcc 480

ccauggacac cuacaugcgu cgcaagugcc aggagugucg gcuucgcaaa ugccgucagg 540

cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc 600

ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc cagggcuucc ucacccccc 660

aaauccugcc ccagcucagc ccggaacaac ugggcaugau cgagaagcuc gucgcugccc 720

agcaacagug uaaccggcgc uccuuuucug accggcuucg agucacgccu uggcccaugg 780

caccagaucc ccauagccgg gaggcccguc agcagcgcuu ugcccacuuc acugagcugg 840

ccaucgucuc ugugcaggag auaguugacu uugcuaaaca gcuacccggc uuccugcagc 900

ucagccggga ggaccagauu gcccugcuga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg 960

agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu 1020

auaaccggga agacuuugcc aaagcagggc ugcaagugga auucaucaac cccaucuucg 1080

aguucuccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguuugcc uugcucauug 1140

cuaucagcau cuucucugca gaccggccca acgugcagga ccagcuccag guagagaggc 1200

ugcagcacac auauguggaa gcccugcaug ccuacgucuc cauccaccau ccccaugacc 1260

gacugauguu cccacggaug cuaaugaaac uggugagccu ccggacccug agcagcgucc 1320

acucagagca aguguuugca cugcgucugc aggacaaaaa gcucccaccg cugcucucug 1380

agaucuggga ugugcacgaa ugacuguucu gucccauau uuucuguuuu cuuggccgga 1440

uggcugaggc cugguggcug ccuccuagaa guggaacaga cugagaaggg caaacauucc 1500

ugggagcugg gcaaggagau ccucccgugg cauuaaaaga gagucaaagg guugcgaguu 1560

uuguggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug 1620

accccacaaa cggaugggcc ugggggccac uuugcacagg guucuccaga gcccugccca 1680

uccugccucc accacuuccu guuuuuccca cagggcccca agaaaaauuc uccacuguca 1740

aaaaaaaa 1748

<210> 26
<211> 402

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

```
Met Pro His Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala
1               5                  10                  15

Glu Pro Thr Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr
            20                  25                  30

Glu Ile Arg Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu
        35                  40                  45

Gly Asn Glu Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His
    50                  55                  60

Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser
65                  70                  75                  80

Val Ile Lys Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro
                85                  90                  95

Met Asp Thr Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys
            100                 105                 110

Cys Arg Gln Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln
        115                 120                 125

Ile Arg Leu Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala
    130                 135                 140

Thr Ser Leu Pro Pro Arg Ala Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln
145                 150                 155                 160

Leu Ser Pro Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln
                165                 170                 175

Gln Gln Cys Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro
            180                 185                 190

Trp Pro Met Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg
        195                 200                 205

Phe Ala His Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val
    210                 215                 220

Asp Phe Ala Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Gln Ile Ala Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu
                245                 250                 255

Thr Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys
            260                 265                 270

Asp Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val
        275                 280                 285

Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu
    290                 295                 300

Gln Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe
305                 310                 315                 320

Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu
                325                 330                 335

Gln His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His
            340                 345                 350

Pro His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser
        355                 360                 365

Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg
    370                 375                 380

Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val
385                 390                 395                 400

His Glu
```

<210> 27
<211> 1928
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```
gauucuaacu uagcuaagca augcuacugg agaccauagg caaagccaag guacagcuuc      60

agggaagucu uuggugagcc caucucucau uaccaaggua acgaagcgca gacuccgggc     120

ccgggugggc ggcaucacca ccagguucac gccgagaagg agcuggagga gagccgcccg     180

gcuccagccg gaccgcuugc ccgccaucac cguuguaauc uaugcagcaa acaagcugga     240

acccgcuggg uggcaccugc aagcagccgc ccggacgcac ccacucugcg guggagcugu     300

ggaagccagg cgcacaggau gcaagcagcc aggcccaggg aggcagcagc ugcauccuca     360
```

gagaggaagc caggaugccc cacucugcug gggguacugc aggggugggg cuggaggcug 420

cagagcccac agcccugcuc accagggcag agcccccuuc agaacccaca gagauccguc 480

cacaaaagcg gaaaaagggg ccagccccca aaaugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu 540

guggggacaa ggccucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau 600

ucuuccgccg cagcgucauc aagggagcgc acuacaucug ccacaguggc ggccacugcc 660

ccauggacac cuacaugcgu cgcaagugcc aggagugucg gcuucgcaaa ugccgucagg 720

cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc 780

ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc cagggcuucc ucacccccc 840

aaauccugcc ccagcucagc ccggaacaac ugggcaugau cgagaagcuc gucgcugccc 900

agcaacagug uaaccggcgc uccuuuucug accggcuucg agucacgccu uggcccaugg 960

caccagaucc ccauagccgg gaggcccguc agcagcgcuu ugcccacuuc acugagcugg 1020

ccaucgucuc ugugcaggag auaguugacu uugcuaaaca gcuacccggc uuccugcagc 1080

ucagccggga ggaccagauu gcccugcuga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg 1140

agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu 1200

auaaccggga agacuuugcc aaagcagggc ugcaagugga auucaucaac cccaucuucg 1260

aguucuccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguuugcc uugcucauug 1320

cuaucagcau cuucucugca gaccggccca acgugcagga ccagcuccag guagagaggc 1380

ugcagcacac auauguggaa gcccugcaug ccuacgucuc cauccaccau ccccaugacc 1440

gacugauguu cccacggaug cuaaugaaac uggugagccu ccggacccug agcagcgucc 1500

acucagagca aguguuugca cugcgucugc aggacaaaaa gcucccaccg cugcucucug 1560

agaucuggga ugugcacgaa ugacuguucu gucccauau uuucuguuuu cuuggccgga 1620

uggcugaggc cugguggcug ccuccuagaa guggaacaga cugagaaggg caaacauucc 1680

ugggagcugg gcaaggagau ccucccgugg cauuaaaaga gagucaaagg guugcgaguu 1740

uuguggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug 1800

accccacaaa cggaugggcc ugggggccac uuugcacagg guucuccaga gcccugccca 1860

uccugccucc accacuuccu guuuuuccca cagggcccca agaaaaauuc uccacuguca 1920

aaaaaaaa 1928

<210> 28
<211> 453
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```
Met Gln Gln Thr Ser Trp Asn Pro Leu Gly Gly Thr Cys Lys Gln Pro
1               5                  10                  15

Pro Gly Arg Thr His Ser Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln
            20                  25                  30

Asp Ala Ser Ser Gln Ala Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu
        35                  40                  45

Glu Ala Arg Met Pro His Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Ala Ala Glu Pro Thr Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser
65                  70                  75                  80

Glu Pro Thr Glu Ile Arg Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro
                85                  90                  95

Lys Met Leu Gly Asn Glu Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser
            100                 105                 110

Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
        115                 120                 125

Arg Arg Ser Val Ile Lys Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly
    130                 135                 140

His Cys Pro Met Asp Thr Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg
145                 150                 155                 160

Leu Arg Lys Cys Arg Gln Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser
                165                 170                 175

Glu Glu Gln Ile Arg Leu Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln
            180                 185                 190

Ala His Ala Thr Ser Leu Pro Pro Arg Ala Ser Ser Pro Pro Gln Ile
        195                 200                 205

Leu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val
    210                 215                 220

Ala Ala Gln Gln Gln Cys Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg
225                 230                 235                 240

Val Thr Pro Trp Pro Met Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg
                245                 250                 255
```

```
Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln
            260                 265                 270

Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser
        275                 280                 285

Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met
    290                 295                 300

Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr
305                 310                 315                 320

Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly
                325                 330                 335

Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met
            340                 345                 350

Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile
        355                 360                 365

Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val
    370                 375                 380

Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser
385                 390                 395                 400

Ile His His Pro His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys
                405                 410                 415

Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe
            420                 425                 430

Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile
        435                 440                 445

Trp Asp Val His Glu
    450
```

<210> 29
<211> 2093
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

```
ucgucaaguu ucacgcuccg ccccucuucc ggacgugacg caagggcggg guugccggaa      60

gaaguggcga aguuacuuuu gaggguauuu gaguagcggc ggugugucag gggcuaaaga     120
```

ggaggacgaa gaaaagcaga gcaagggaac ccagggcaac aggaguaguu cacuccgcga 180

gaggccgucc acgagacccc cgcgcgcagc caugagcccc gccccccgcu guugcuugga 240

gaggggcggg accuggagag aggcugcucc gugaccccac cauguccucu ccuaccacga 300

guucccugga uacccccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcgcc ccuucuucuu 360

cacccacugu aaaggaggag gguccggagc cguggcccgg ggguccggac ccugaugucc 420

caggcacuga ugaggccagc ucagccugca gcacagacug ggucauccca gaucccgaag 480

aggaaccaga gcgcaagcga aagaagggcc cagccccgaa gaugcugggc cacgagcuuu 540

gccgugucug uggggacaag gccuccggcu uccacuacaa cgugcucagc ugcgaaggcu 600

gcaagggcuu cuuccggcgc aguguggucc gugguggggc caggcgcuau gccugccggg 660

guggcggaac cugccagaug gacgcuuuca ugcggcgcaa gugccagcag ugccggcugc 720

gcaagugcaa ggaggcaggg augagggagc agugcguccu uucugaagaa cagauccgga 780

agaagaagau ucggaaacaa cagcagcagg agucacaguc acagucgcag ucaccugugg 840

ggccgcaggg cagcagcagc ucagccucug ggccuggggc uuccccuggu ggaucugagg 900

caggcagcca gggcuccggg gaaggcgagg guguccagcu aacagcggcu caagaacuaa 960

ugauccagca guugguggcg gcccaacugc agugcaacaa acgcuccuuc uccgaccagc 1020

ccaaagucac gcccuggccc cugggcgcag acccccaguc ccgagaugcc cgccagcaac 1080

gcuuugccca cuucacggag cuggccauca ucucagucca ggagaucgug gacuucgcua 1140

agcaagugcc ugguuuccug cagcugggcc gggaggacca gaucgcccuc cugaaggcau 1200

ccacuaucga gaucaugcug cuagagacag ccaggcgcua caaccacgag acagagugua 1260

ucaccuucuu gaaggacuuc accuacagca aggacgacuu ccaccgugca ggccugcagg 1320

uggaguucau caacccccauc uucgaguucu cgcgggccau gcggcggcug ggccuggacg 1380

acgcugagua cgcccugcuc aucgccauca acaucuucuc ggccgaccgg cccaacgugc 1440

aggagccggg ccgcguggag gcguugcagc agcccuacgu ggaggcgcug cuguccuaca 1500

cgcgcaucaa gaggccgcag gaccagcugc gcuucccgcg caugcucaug aagcugguga 1560

gccugcgcac gcugagcucu gugcacucgg agcaggucuu cgccuugcgg cuccaggaca 1620

agaagcugcc gccucugcug ucggagaucu gggacgucca cgagugaggg gcuggccacc 1680

cagccccaca gccuugccug accacccucc agcagauaga cgccggcacc ccuuccucuu 1740

ccuagggugg aaggggcccu gggccgagcc uguagaccua ucggcucuca ucccuuggga 1800

uaagccccag uccaggucca ggaggcuccc ucccugccca gcgagucuuc cagaaggggu 1860

gaaaggguug caggucccga ccacugaccc uucccggcug cccucccucc ccagcuuaca 1920

ccucaagccc agcacgcagu gcaccuugaa cagagggagg ggaggaccca uggcucuccc 1980

cccuagcccg ggagaccagg gccuuccucu uccucugcuu uuauuuaaua aaaacuaaaa 2040

acagaaacag gaaaauaaaa uaugaauaca auccagcccg gagcuggagu gca 2093

<210> 30
<211> 461
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly Asn
1 5 10 15

Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys Glu
20 25 30

Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro Gly
35 40 45

Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Val Ile Pro Asp
50 55 60

Pro Glu Glu Glu Pro Glu Arg Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly
85 90 95

Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg
100 105 110

Arg Ser Val Val Arg Gly Gly Ala Arg Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met Arg Arg Lys Cys Gln Gln Cys
130 135 140

Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly Met Arg Glu Gln Cys Val Leu
145 150 155 160

Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln Gln
165 170 175

Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val Gly Pro Gln Gly Ser Ser
180 185 190

Ser Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Gly Ser Glu Ala Gly
195 200 205

```
Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val Gln Leu Thr Ala Ala Gln
    210                 215                 220

Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn Lys
225                 230                 235                 240

Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly Ala
                245                 250                 255

Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr
            260                 265                 270

Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln
        275                 280                 285

Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu
    290                 295                 300

Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg Tyr
305                 310                 315                 320

Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr Ser
                325                 330                 335

Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro
            340                 345                 350

Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp Ala
        355                 360                 365

Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro
    370                 375                 380

Asn Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr Val
385                 390                 395                 400

Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln Leu
                405                 410                 415

Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser
            420                 425                 430

Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys
        435                 440                 445

Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
    450                 455                 460
```

<210> 31
<211> 1802
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

ucgucaaguu ucacgcuccg ccccucuucc ggacgugacg caagggcggg guugccggaa 60

gaaguggcga aguuacuuuu gaggguauuu gaguagcggc ggugugucag gggcuaaaga 120

ggaggacgaa gaaaagcaga gcaagggaac ccagggcaac aggaguaguu cacuccgcga 180

gaggccgucc acgagacccc cgcgcgcagc caugagcccc gccccccgcu guugcuugga 240

gaggggcggg accuggagag aggcugcucc gugaccccac cauguccucu ccuaccacga 300

guucccugga uacccccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcgcc ccuucuucuu 360

cacccacugu aaaggaggag gguccggagc cguggcccgg ggguccggac ccugaugucc 420

caggcacuga ugaggccagc ucagccugca gcacagacug gggcguccuu ucugaagaac 480

agauccggaa gaagaagauu cggaaacaac agcagcagga gucacaguca cagucgcagu 540

caccuguggg gccgcagggc agcagcagcu cagccucugg gccuggggcu uccccuggug 600

gaucugaggc aggcagccag ggcuccgggg aaggcgaggg uguccagcua acagcggcuc 660

aagaacuaau gauccagcag uugguggcgg cccaacugca gugcaacaaa cgcuccuucu 720

ccgaccagcc caaagucacg cccuggcccc ugggcgcaga cccccagucc cgagaugccc 780

gccagcaacg cuuugcccac uucacggagc uggccaucau cucaguccag gagaucgugg 840

acuucgcuaa gcaagugccu gguuuccugc agcugggccg ggaggaccag aucgcccucc 900

ugaaggcauc cacuaucgag aucaugcugc uagagacagc caggcgcuac aaccacgaga 960

cagaguguau caccuucuug aaggacuuca ccuacagcaa ggacgacuuc caccgugcag 1020

gccugcaggu ggaguucauc aaccccaucu ucgaguucuc gcgggccaug cggcggcugg 1080

gccuggacga cgcugaguac gcccugcuca ucgccaucaa caucuucucg gccgaccggc 1140

ccaacgugca ggagccgggc cgcguggagg cguugcagca gcccuacgug gaggcgcugc 1200

uguccuacac gcgcaucaag aggccgcagg accagcugcg cuucccgcgc augcucauga 1260

agcuggugag ccugcgcacg cugagcucug ugcacucgga gcaggucuuc gccuugcggc 1320

uccaggacaa gaagcugccg ccucugcugu cggagaucug ggacguccac gagugagggg 1380

cuggccaccc agccccacag ccuugccuga ccacccucca gcagauagac gccggcaccc 1440

cuuccucuuc cuagggugga aggggcccug ggccgagccu guagaccuau cggcucucau 1500

cccuugggau aagccccagu ccagguccag gaggcucccu cccugcccag cgagucuucc 1560

agaaggggug aaaggguugc aggucccgac cacugacccu ucccggcugc ccucccuccc 1620

cagcuuacac cucaagccca gcacgcagug caccuugaac agagggaggg gaggacccau 1680

ggcucucccc ccuagcccgg gagaccaggg ccuuccucuu ccucugcuuu uauuuaauaa 1740

aaacuaaaaa cagaaacagg aaaauaaaau augaauacaa uccagcccgg agcuggagug 1800

ca 1802

<210> 32
<211> 364
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

```
Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly Asn
1               5                  10                  15

Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys Glu
            20                  25                  30

Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro Gly
        35                  40                  45

Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Gly Val Leu Ser
    50                  55                  60

Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln Gln Glu
65                  70                  75                  80

Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val Gly Pro Gln Gly Ser Ser Ser
                85                  90                  95

Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Gly Ser Glu Ala Gly Ser
            100                 105                 110

Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val Gln Leu Thr Ala Ala Gln Glu
        115                 120                 125

Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn Lys Arg
    130                 135                 140

Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly Ala Asp
145                 150                 155                 160

Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr Glu
                165                 170                 175

Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln Val
            180                 185                 190

Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys
```

195 200 205

Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg Tyr Asn
210 215 220

His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr Ser Lys
225 230 235 240

Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile
245 250 255

Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp Ala Glu
260 265 270

Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn
275 280 285

Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr Val Glu
290 295 300

Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln Leu Arg
305 310 315 320

Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser
325 330 335

Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu
340 345 350

Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
355 360

<210> 33
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 33
gccaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60

auugguuagg c 71

<210> 34
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 34
aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60

ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110

<210> 35
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 35
cgggaaugcc gcggcgggga cggcgauugg uccguaugug uggugccacc ggccgccggc 60

uccgccccgg cccccgcccc 80

<210> 36
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 36
uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60

aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110

<210> 37
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 37
cuggauacag aguggaccgg cuggccccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60

acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca 110

<210> 38
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 38
agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60

uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110

<210> 39
<211> 71
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 39
gatccgacag tagcctgcac attagtcact tcctgtcagt aaccaatgtg cagactactg 60

ttttttgaat t 71

<210> 40
<211> 73
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 40
gatccgccca gtgctcagac tacccgtgcc ttcctgtcag gaacaggtag tctgaacact 60

gggtttttga att 73

<210> 41
<211> 69
<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 41
gatccgcggc gggaacggcg atcggccctt cctgtcagga ccaatcgccg tccccgccgt 60

ttttgaatt 69

<210> 42
<211> 73
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 42
gatccgtgga agattagtga gtttattatc ttcctgtcag acaacaaaat cactagtctt 60

ccatttttga att 73

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 43

Thr Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ala Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 45

Thr Ala Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 46

Thr Gln Ala Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 47
Thr Gln Gln Ala Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 48
Thr Gln Gln Ile Ala Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 49
Gln Thr Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10 15

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 50
Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala Glu Ile Phe Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 51
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> shAPOE sintético

<400> 51
ccgggaagga gttgaaggcc tacaactcga gttgtaggcc ttcaactcct tcttttt 57

<210> 52
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> shAPOE sintético

<400> 52
ccgggcagac actgtctgag caggtctcga gacctgctca gacagtgtct gcttttt 57

<210> 53
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> shDNAJA sintético

<400> 53
ccgggcgaga agtttaaact catatctcga gatatgagtt taaacttctc gcttttt 57

<210> 54
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> shDNAJA4 sintético

<400> 54
ccggcctcga cagaaagtga ggattctcga gaatcctcac tttctgtcga ggttttt 57

<210> 55
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo ApoE sintético

<400> 55
tcatgaggat ccatgaaggt tctgtgggct 30

<210> 56
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso ApoE sintético

<400> 56
tagcagaatt ctcagtgatt gtcgctggg 29

<210> 57
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo DNAJA4 sintético

<400> 57
atccctggat ccatgtggga aagcctgacc c 31

<210> 58
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso DNAJA4 sintético

<400> 58
taccatgtcg actcatgccg tctggcactg c 31

<210> 59
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia diana LRP1 sintética

<400> 59
cgaggacgau gacugcuua 19

<210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia diana LRP1 sintética

<400> 60
gcuaugaguu uaagaaguu 19

<210> 61
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia diana LRP8 sintética

<400> 61
cgaggacgau gacugcuua 19

<210> 62
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia diana LRP8 sintética

<400> 62
gaacuauuca cgccucauc 19

<210> 63

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo ApoE sintético

<400> 63
tgggtcgctt ttgggattac 20

<210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso ApoE sintético

<400> 64
ttcaactcct tcatggtctc g 21

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo DNAJA4 sintético

<400> 65
ccagcttctc ttcacccatg 20

<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso DNAJA4 sintético

<400> 66
gccaatttct tcgtgactcc 20

<210> 67
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo GAPDH sintético

<400> 67
agccacatcg ctcagacac 19

<210> 68
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético GAPDH sintético

<400> 68
gcccaatacg accaaatcc 19

<210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo LRP1 sintético

<400> 69
tttaacagca ccgagtacca g 21

<210> 70
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso LRP1 sintético

<400> 70
caggcagatg tcagagcag 19

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo LRP8 sintético

<400> 71
gctaccctgg ctacgagatg 20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso LRP8 sintético

<400> 72
gattagggat gggctcttgc 20

<210> 73
<211> 8
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de semilla miARN sintética

<400> 73
caguaguc 8

<210> 74
<211> 8
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de semilla miARN sintética

<400> 74
ccaguguu 8

<210> 75
<211> 8
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de semilla miARN sintética

<400> 75
ggcgggga 8

<210> 76
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 76
agtacctcga ggggatcctt gagtcctact c 31

<210> 77
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 77
taattgcggc cgctcagaca gtgtctgcac ccag 34

<210> 78
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 78
taatatctcg agatgtggga aagcctgacc c 31

<210> 79
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 79
caattgcggc cgctcatgcc gtctggcact gc 32

<210> 80
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 80
ttagcctcga gacgccgaag cctgcagcca 30

<210> 81
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 81
ttactgcggc cgctgcgtga aacttggtga atctt 35

<210> 82
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 82
taatatctcg agcgtggtgc ggggcagcgt 30

<210> 83
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 83
caattgcggc cgcttatctc tcataccagc tcaat 35

<210> 84
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 84
gccagcgctg ggaactggca actggtcgct tttgggatta cct 43

<210> 85
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 85
cagcgggaga ccctgtcccc ataccagccg tcctcctggg gtg 43

<210> 86
<211> 43

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 86
tccccgcccc agccgtcctc acagggtgga ccctagttta ata 43

<210> 87
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 87
gggatcggtg gagaagtgcc tattgtgcaa ggggcggggg atg 43

<210> 88
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 88
gtagggggcg gggaacgtgt tatccgtgaa gaggtggcta ggg 43

<210> 89
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 89
cagggccaac ttagttccta acattctgtg cccttcagtg gat 43

<210> 90
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 90
acagtttgta tggactacta tcttaaatta tagcttgttt gga 43

<210> 91
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 91
taattattgc taaagaacta tgttttagtt ggtaatggtg taa 43

<210> 92
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 92
cagctgcacg gaccaggttc cataaaaaca ttgccagcta gtgag 45

<210> 93
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 93
tgagtatttt tgtggcaact gc 22

<210> 94
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 94
ctctgctggg aaagcggc 18

<210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 95
caagcactct gcgaactgag 20

<210> 96
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 96
aagtttttga aggcaagatg c 21

<210> 97
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 97
gcggtctggc agtaaaaact atc 23

<210> 98
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 98
gtgaaacagc attgctgtca ctt 23

<210> 99
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 99
ctaggccaca gaattgaaag atct 24

<210> 100
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 100
gtaggtggaa attctagcat catcc 25

<210> 101
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 101
gcctagccga gggagagccg 20

<210> 102
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 102
tgtgacttgg gagctctgca gc 22

<210> 103
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 103
gccgccccga ctgcatct 18

<210> 104
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 104
tcagtggagg gaaggaaatg 20

<210> 105
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 105
ttcctgccct ggacacttac 20

<210> 106
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 106
ttgtgcccag tcatagccga at 22

<210> 107
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 107
cctttctcc ctgacaccg 19

<210> 108
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 108
gcatccatct ggcaggttc 19

<210> 109
<211> 20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 109
aggtgagatg acaggagatc 20

<210> 110
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 110
ccggccgact gatgttccca cggatctcga gatccgtggg aacatcagtc ggttttt 57

<210> 111
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 111
ccgggcaact caatgatgcc gagttctcga gaactcggca tcattgagtt gcttttt 57

<210> 112
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 112
ccggagagtg tatcaccttc ttgaactcga gttcaagaag gtgatacact cttttt 57

<210> 113
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 113
ccgggaaggc atccactatc gagatctcga gatctcgata gtggatgcct tcttttt 57

<210> 114
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 114
ccgggcagac actgtctgag caggtctcga gacctgctca gacagtgtct gcttttt 57

<210> 115
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 115
ccgggcaact caatgatgct gagttctcga gaactcagca tcattgagtt gcttttt 57

<210> 116
<211> 58
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 116
ccggtgagat catgttgcta gaaacctcga ggtttctagc aacatgatct catttttg 58

<210> 117
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 117
ccgggaggac actatgacgg aagtactcga gtacttccgt catagtgtcc tcttttt 57

<210> 118
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 118
tgggtcgctt ttgggattac 20

<210> 119
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 119
ttcaactcct tcatggtctc g 21

<210> 120
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 120

agccacatcg ctcagacac 19

<210> 121
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 121
gcccaatacg accaaatcc 19

<210> 122
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 122
gttataaccg ggaagacttt gc 22

<210> 123
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 123
aaactcggca tcattgagtt g 21

<210> 124
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 124
tttgagggta tttgagtagc gg 22

<210> 125
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 125
ctctcgcgga gtgaactac 19

<210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 126
gaccctggag gctaaggact 20

<210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 127
agagccttca tcttcgcaat 20

<210> 128
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 128
gcacagtcaa ggccgagaat 20

<210> 129
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 129
gccttctcca tggtggtgaa 20

<210> 130
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 130
gcgctcagct cttgtcact 19

<210> 131
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 131
ctccagccac aaggacatct 20

<210> 132
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 132
gctctgccta catcgtggtc 20

<210> 133
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 133
ctcatggccc agcatctt 18

<210> 134
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 134
atggagcagg gaagaccac 19

<210> 135
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 135
gtaggccgtg ccagaagtt 19

<210> 136
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 136
tcatagctag cgcagagcca ggattcacgc cctg 34

<210> 137
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 137
tggtcctcga ggaaccttca tcttcctgcc tgtga 35

<210> 138
<211> 30

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 138
tagttacgcg tagtagcccc catctttgcc 30

<210> 139
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 139
aatcagctag cccctcagct gcaaagctc 29

<210> 140
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 140
tagttacgcg tagtagcccc ctctttgcc 29

<210> 141
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

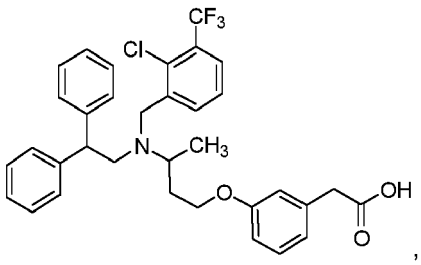
<220>
<223> Cebador sintético

<400> 141
aatcagctag cccttcagct gcaaagctct g 31

REIVINDICACIONES

1. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita mediante ralentización de la diseminación de metástasis del cáncer y mediante el incremento del nivel de expresión o el nivel de actividad de ApoE,

en donde el cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer colorrectal, linfoma, carcinoma hepatocelular, y cáncer de próstata, y en donde el agonista de LXRβ es:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de colon, o cáncer de ovario.

3. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer es cáncer de mama.

4. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.

5. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

6. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer es cáncer de células renales.

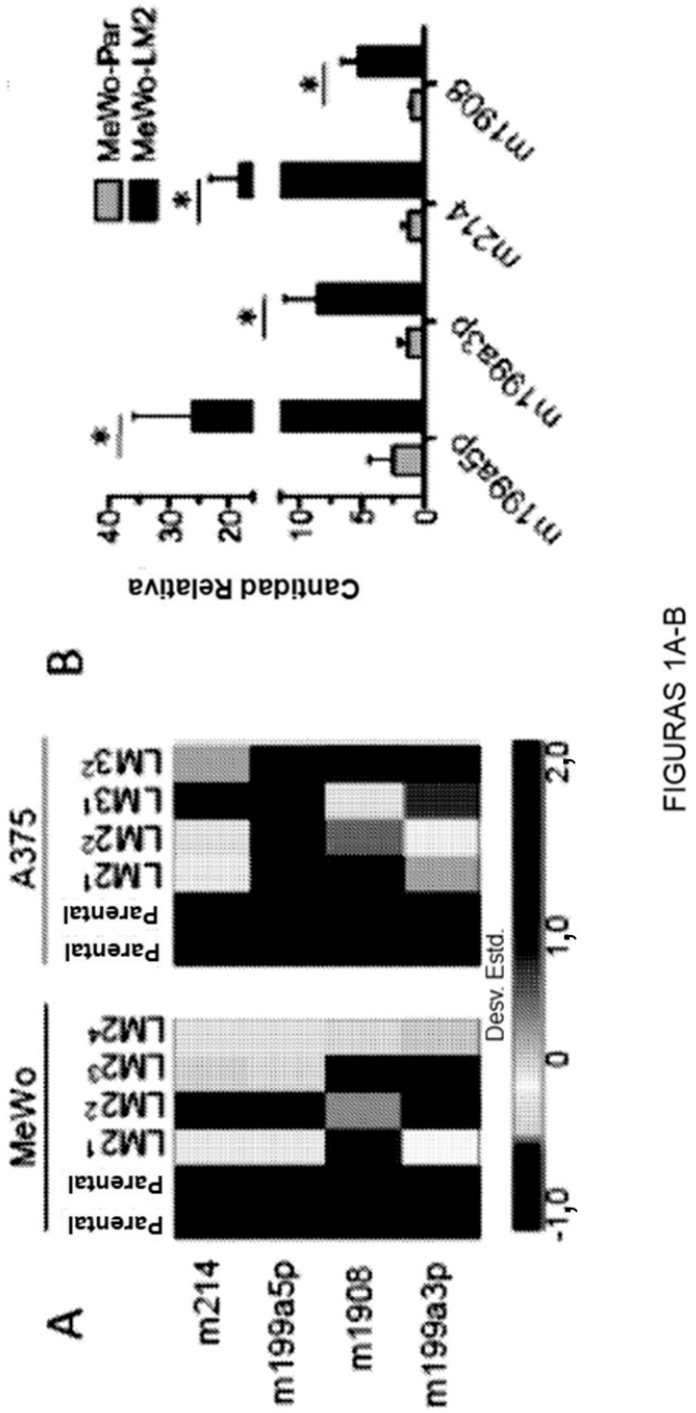
7. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cáncer es resistente a vemurafenib, dacarbazina, un inhibidor de BRAF, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD1, un inhibidor de MEK, y/o un inhibidor de PDL1.

8. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento comprende administrar un antiproliferativo de la tabla 2, en donde el agonista de LXRβ y el antiproliferativo de la tabla 2 se administran en una cantidad que, conjuntamente, es suficiente para ralentizar la progresión del cáncer migratorio.

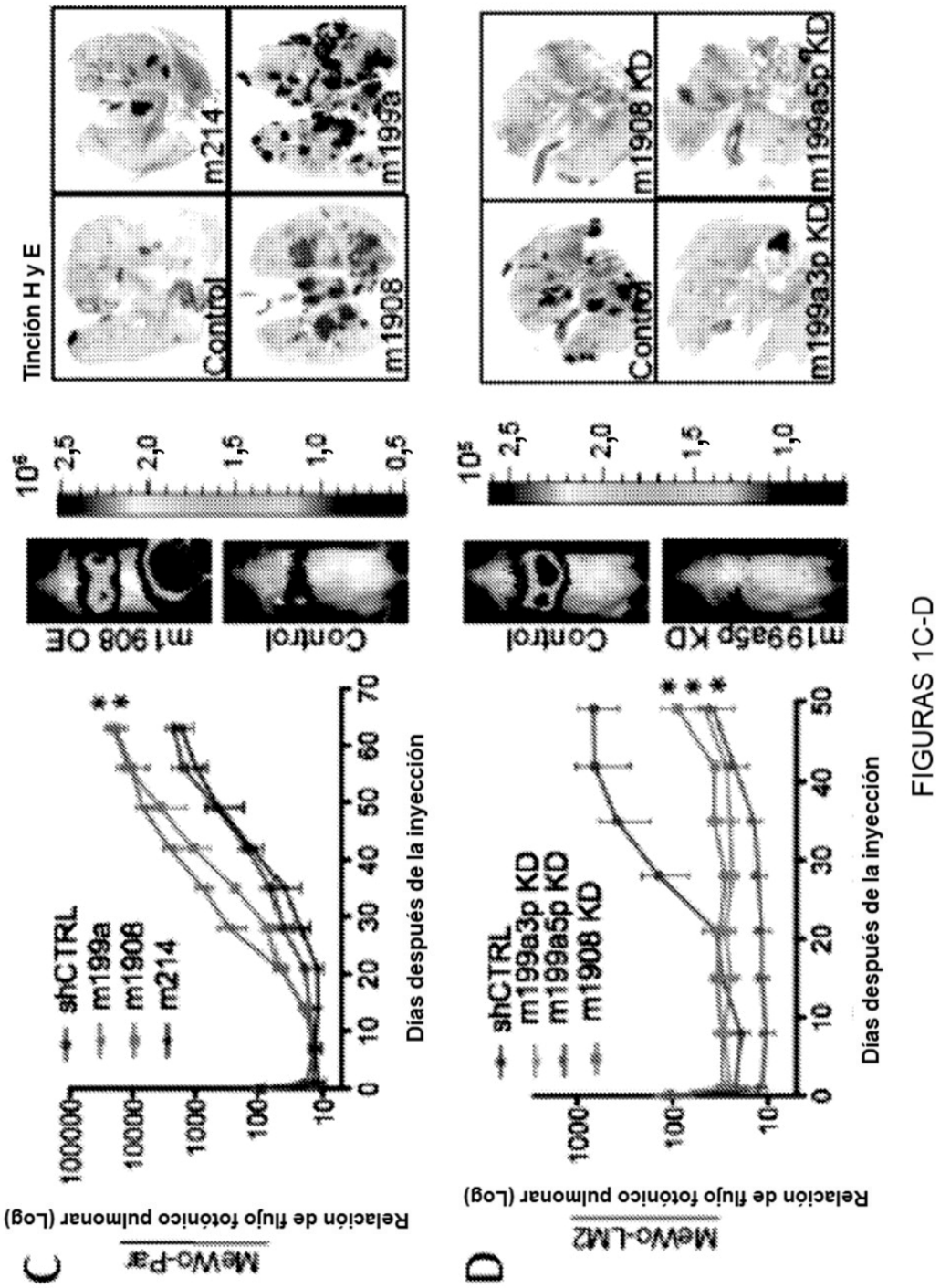
9. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células primarias.

10. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su administración en combinación con ipilimumab.

11. Agonista de LXRβ, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el cáncer es cáncer de endometrio.


A
MeWo
Parental
LM2 1
LM2 2
LM2 3
LM2 4
A375
Parental
LM2 1
LM2 2
LM3 1
LM3 2
m214
m199a5p
m1908
m199a3p
Desv. Estd.
2,0
1,0
0
-1,0
B
MeWo-Par
MeWo-LM2
Cantidad Relativa
40
30
20
10
5
0
m199a5p
m199a3p
m214
m1908

FIGURAS 1A-B


C
MeWo-Par
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
shCTRL
m199a
m1908
m214
Dias después de la inyección
m1908 OE
Control
Tinción H y E
Control
m1908
m214
m199a
D
MeWo-LM2
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
shCTRL
m199a3p KD
m199a5p KD
m1908 KD
Dias después de la inyección
m199a5p KD
Control
Control
m1908 KD
m199a3p KD
m199a5p KD

FIGURAS 1C-D

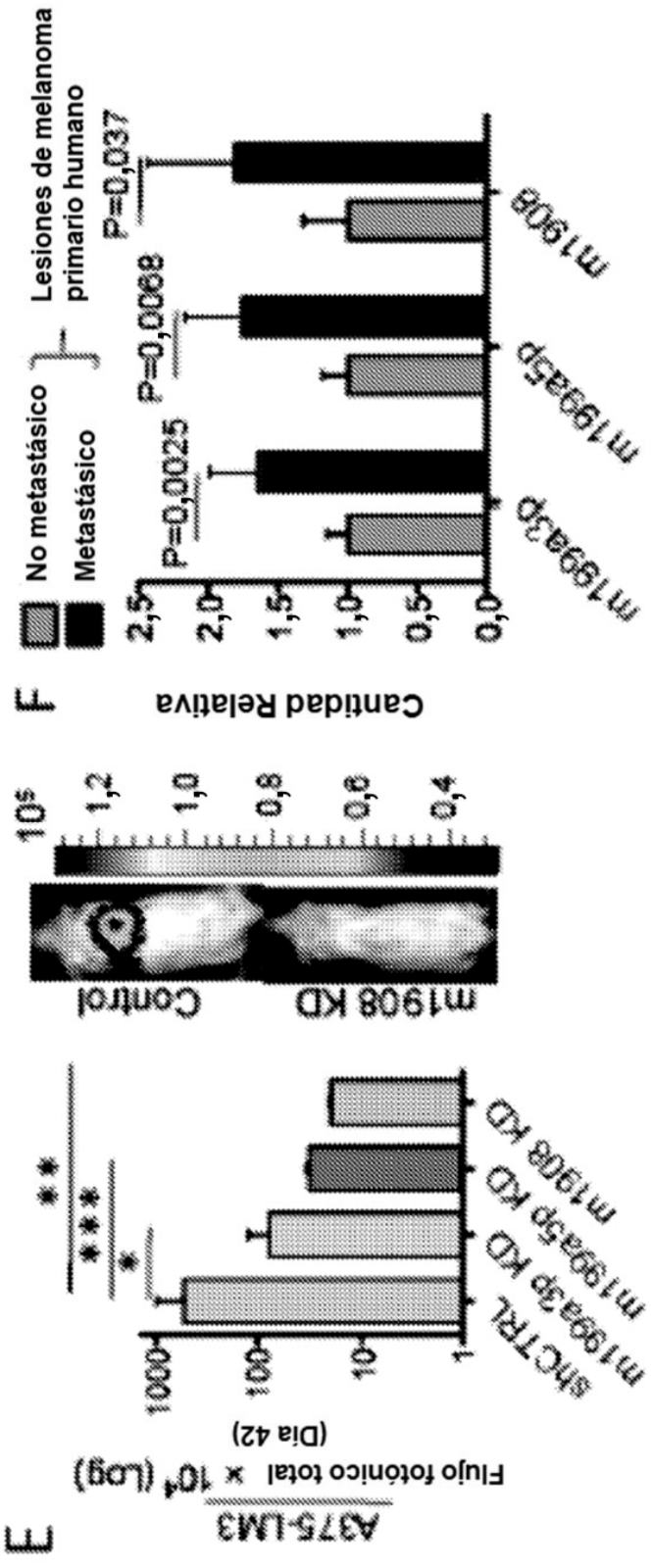
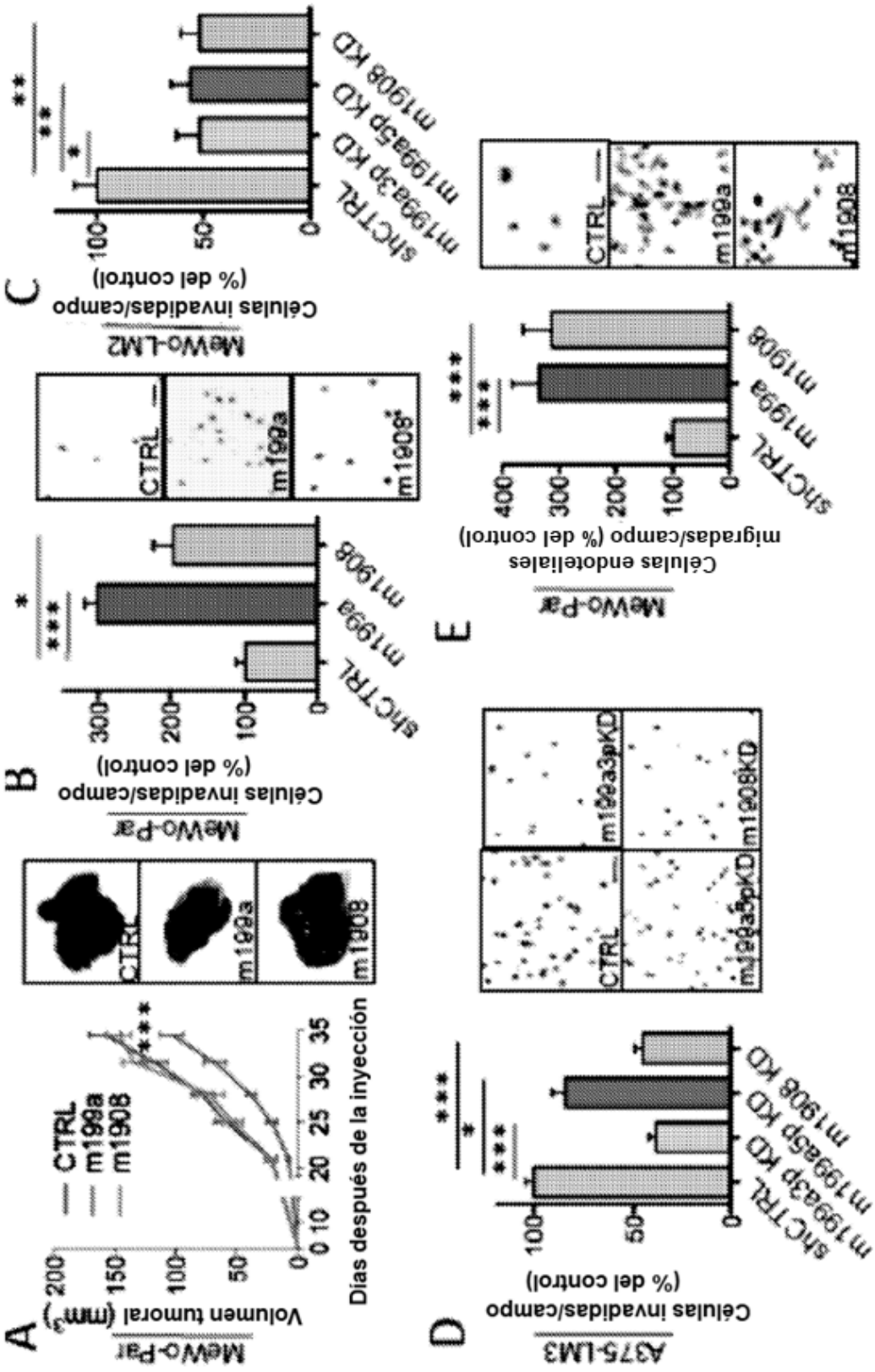
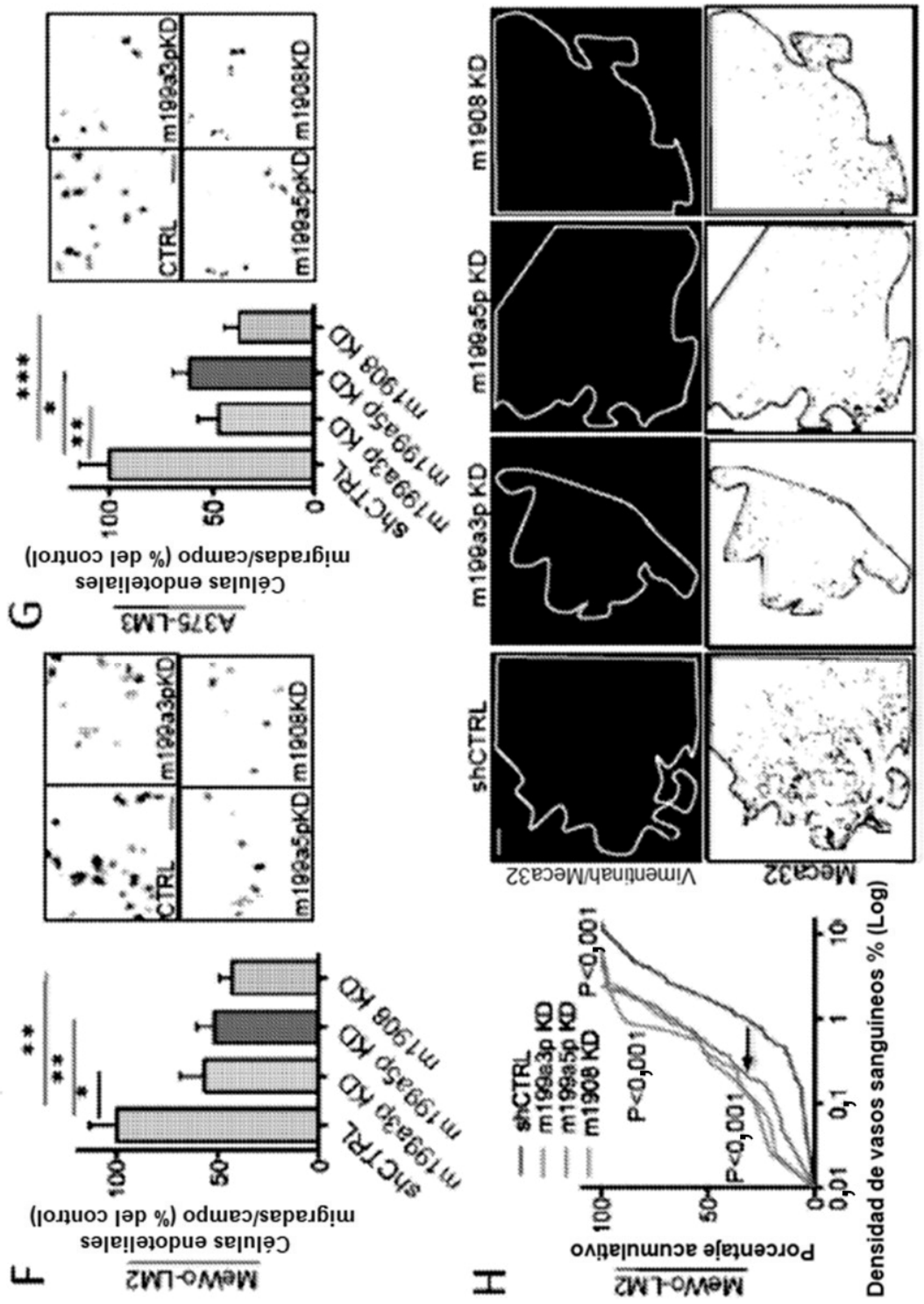

E
A375-LM3
Flujo fotónico total × 10⁴ (Log)
(Día 42)
1000
100
10
1
shCTRL
m1908a3p KD
m1908a5p KD
m1908 KD
***
**
*
m1908 KD
Control
10⁵
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
F
Cantidad Relativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
No metastásico
Metastásico
Lesiones de melanoma primario humano
P=0,037
P=0,0068
P=0,0025
m1908
m1908a5p
m1908a3p

FIGURA 1E

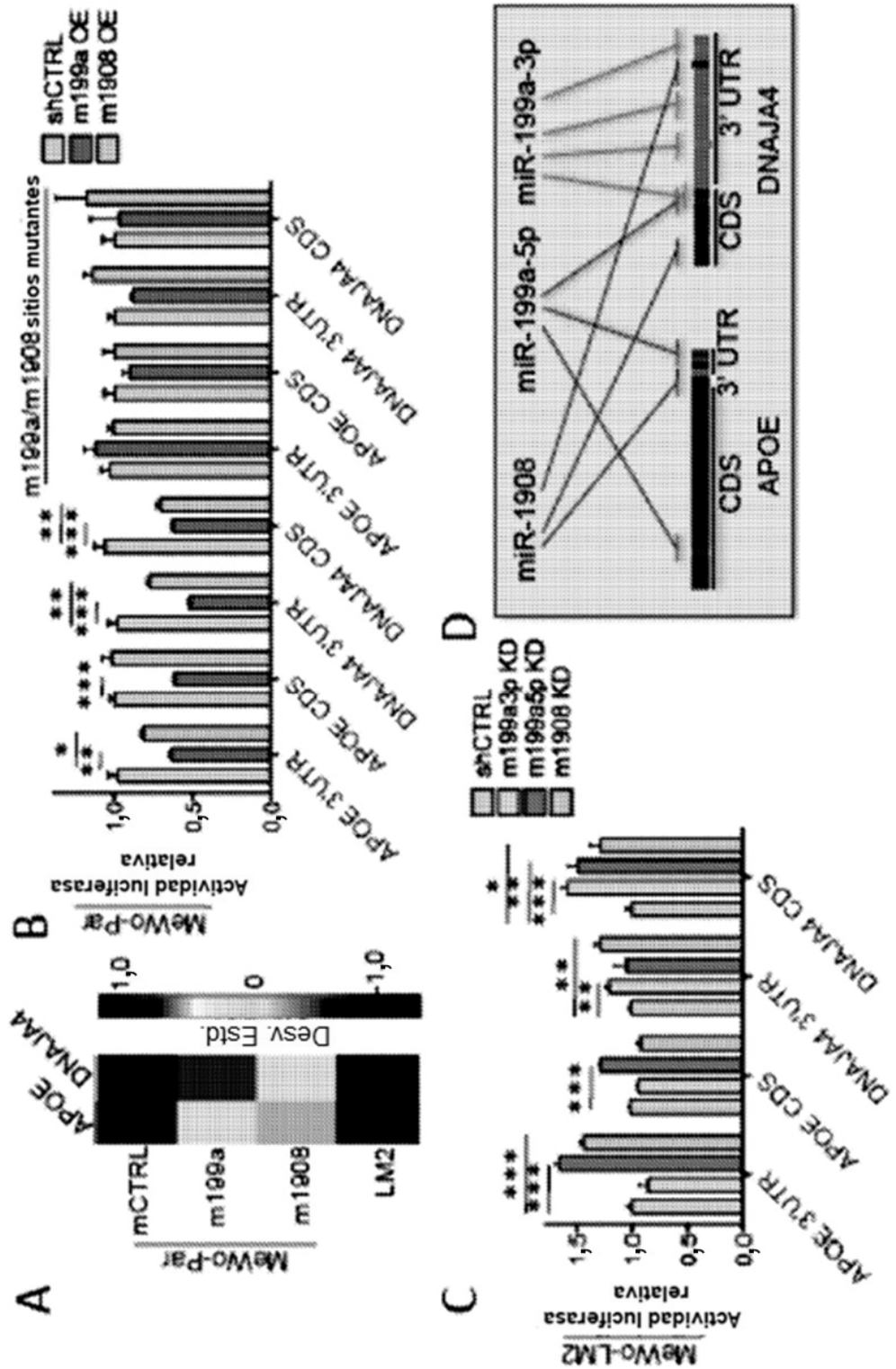

A
MeWo-Par
Volumen tumoral (mm³)
200
150
100
50
0
0 10 20 25 30 35
Dias después de la inyección
CTRL
m199a
m1908
***
B
MeWo-Par
Células invadidas/campo
(% del control)
300
200
100
0
shCTRL
m199a
m1908
*
***
C
MeWo-LM2
Células invadidas/campo
(% del control)
100
50
0
shCTRL
m199a3p KD
m199a5p KD
m1908 KD
*
**
**
D
A375-LM3
Células invadidas/campo
(% del control)
100
50
0
shCTRL
m199a3p KD
m199a5p KD
m1908 KD
***
*
***
m199a3pKD
m1908KD
CTRL
E
MeWo-Par
Células endoteliales
migradas/campo (% del control)
400
300
200
100
0
shCTRL
m199a
m1908
***
***
CTRL
m199a
m1908

FIGURAS 2A-E

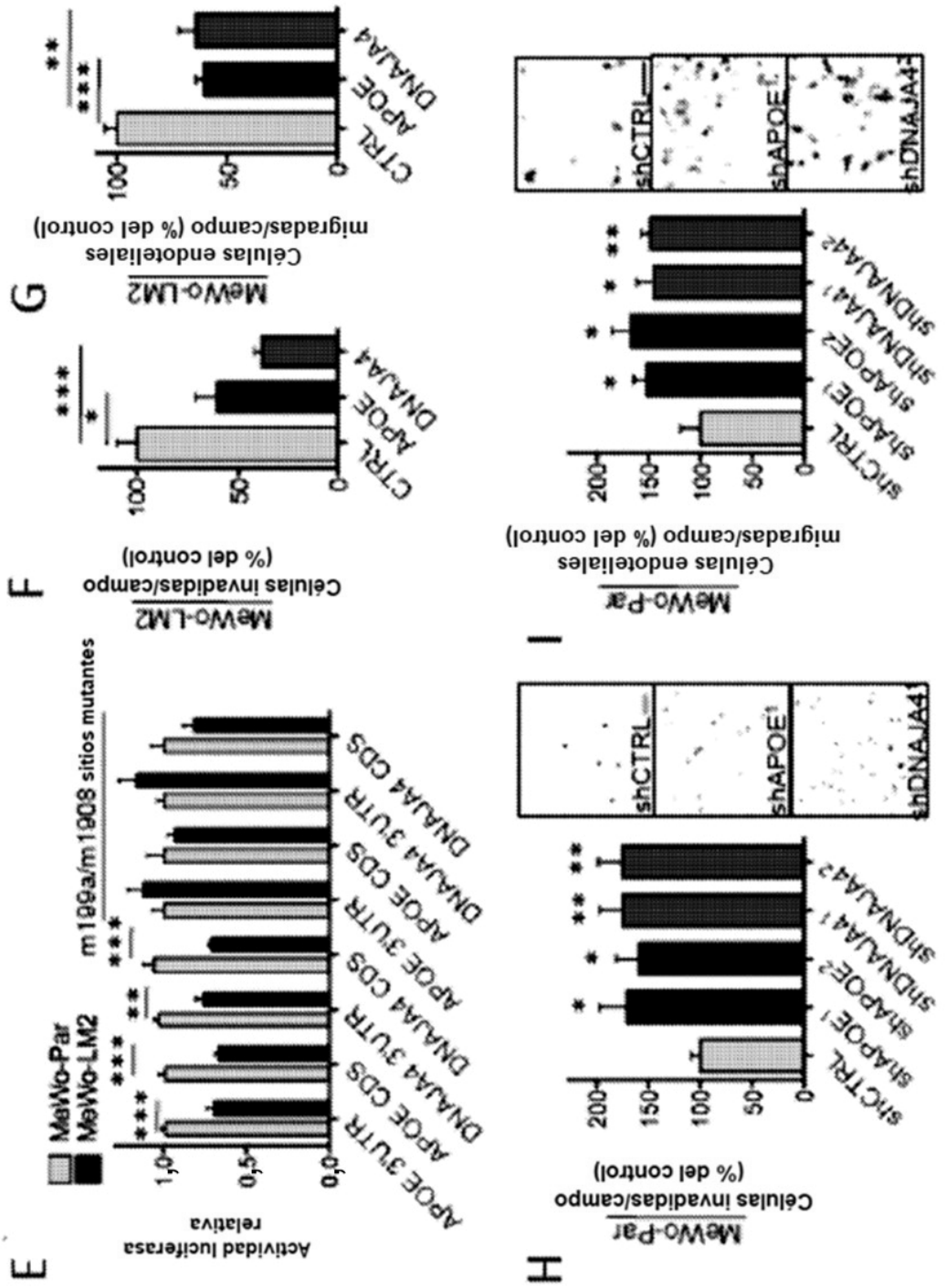

F
MeWo-LM2
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
shCTRL
m199a3p KD
m199a5p KD
m1908 KD
CTRL
m199a3pKD
m199a5pKD
m1908KD
G
A375-LM3
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
H
MeWo-LM2
Porcentaje acumulativo
shCTRL
m199a3p KD
m199a5p KD
m1908 KD
P<0,001
Densidad de vasos sanguíneos % (Log)
Vimentina/Meca32
Meca32

FIGURAS 2G-H

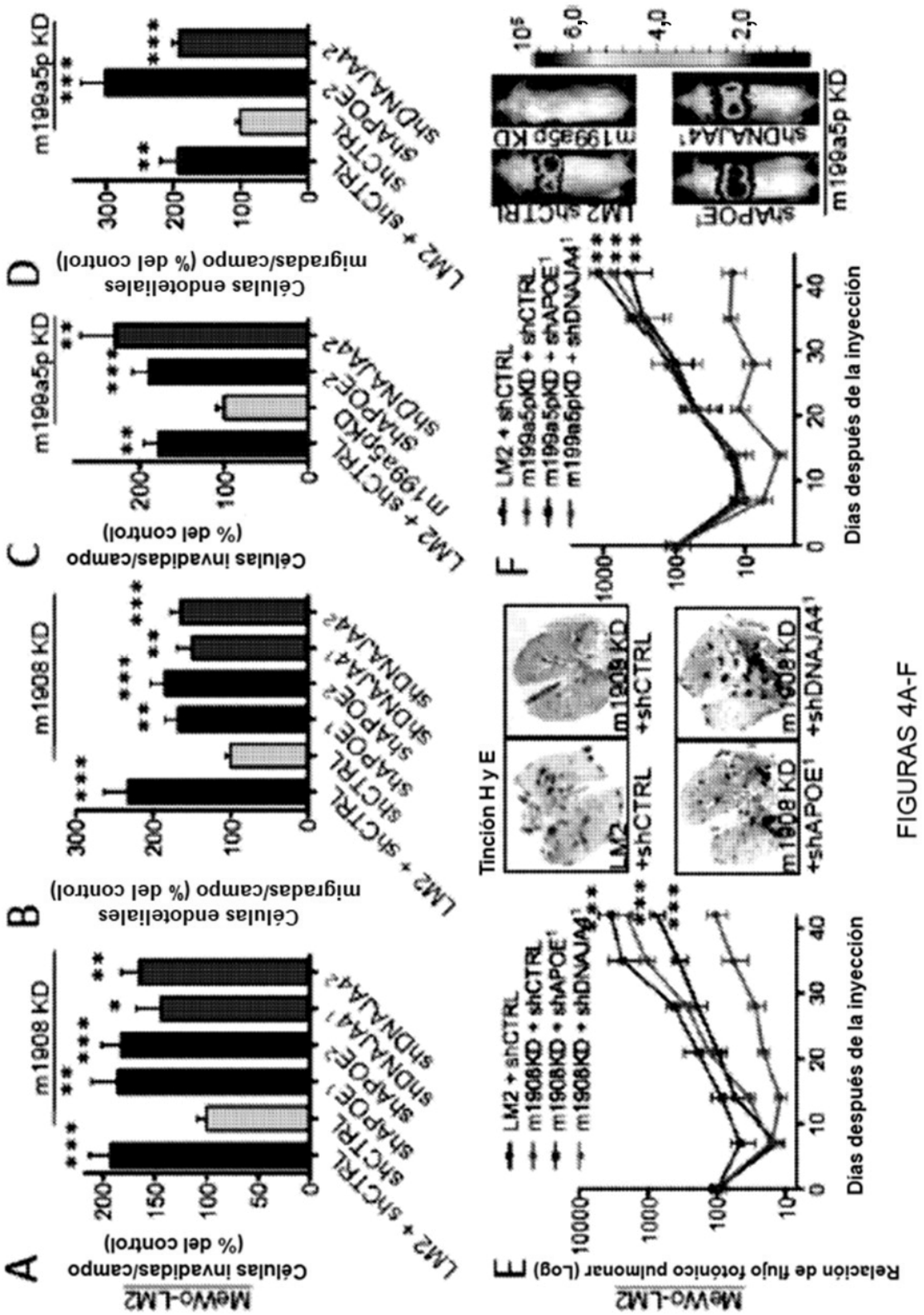
Figura 3



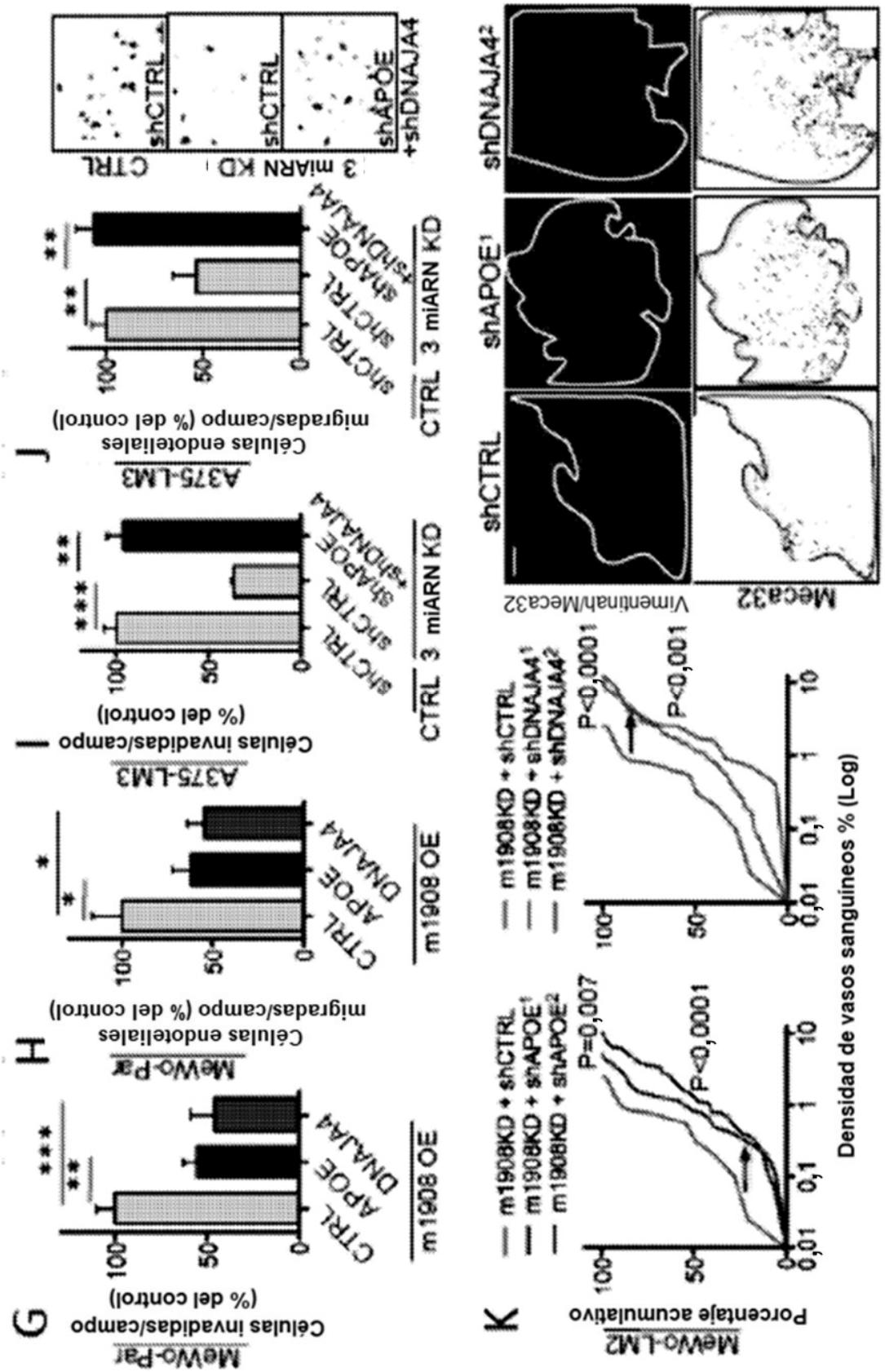
FIGURAS 3A-D


E
MeWo-Par
MeWo-LM2
m1899a/m1908 sitios mutantes
Actividad luciferasa relativa
APOE 3UTR
APOE CDS
DNAJA4 3UTR
DNAJA4 CDS
APOE 3UTR
APOE CDS
DNAJA4 3UTR
DNAJA4 CDS
F
MeWo-LM2
Células invadidas/campo (% del control)
CTRL
APOE
DNAJA4
G
MeWo-LM2
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
CTRL
APOE
DNAJA4
H
MeWo-Par
Células invadidas/campo (% del control)
shCTRL
shAPOE1
shAPOE2
shDNAJA4 1
shDNAJA4 2
shCTRL
shAPOE1
shDNAJA41
I
MeWo-Par
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
shCTRL
shAPOE1
shDNAJA4-2

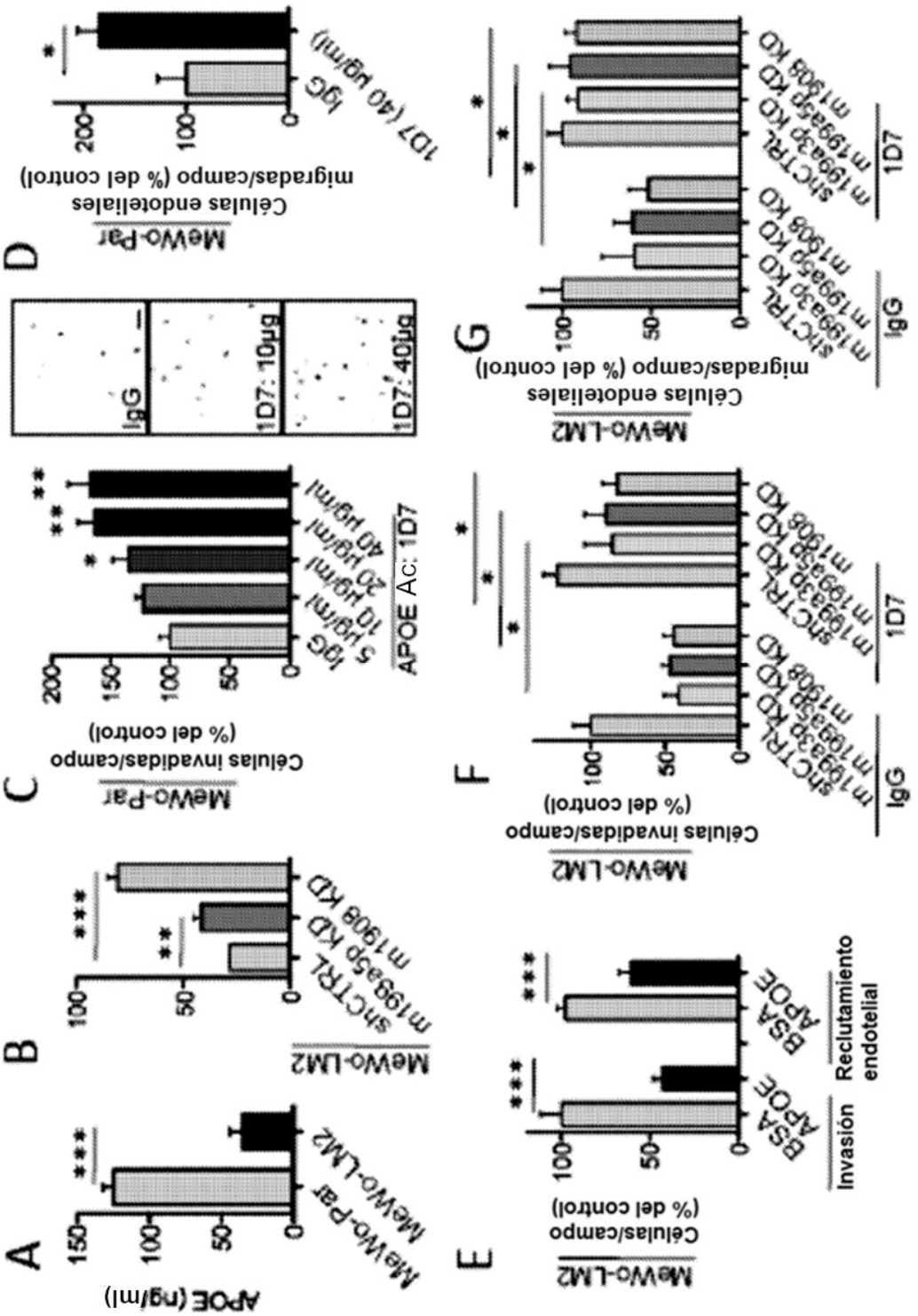
FIGURAS 3E-I


A
B
C
D
E
F
MeWo-LM2
m1908 KD
m199a5p KD
Células invadidas/campo (% del control)
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
LM2 + shCTRL
shCTRL
shAPOE1
shAPOE2
shDNAJA41
shDNAJA42
m1908KD + shCTRL
m1908KD + shAPOE1
m1908KD + shDNAJA41
m199a5pKD + shCTRL
m199a5pKD + shAPOE1
m199a5pKD + shDNAJA41
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
Días después de la inyección
Tinción H y E
LM2 +shCTRL
m1908 KD +shCTRL
m1908 KD +shAPOE1
m1908 KD +shDNAJA41
LM2 shCTRL
shAPOE1
shDNAJA41
m199a5p KD

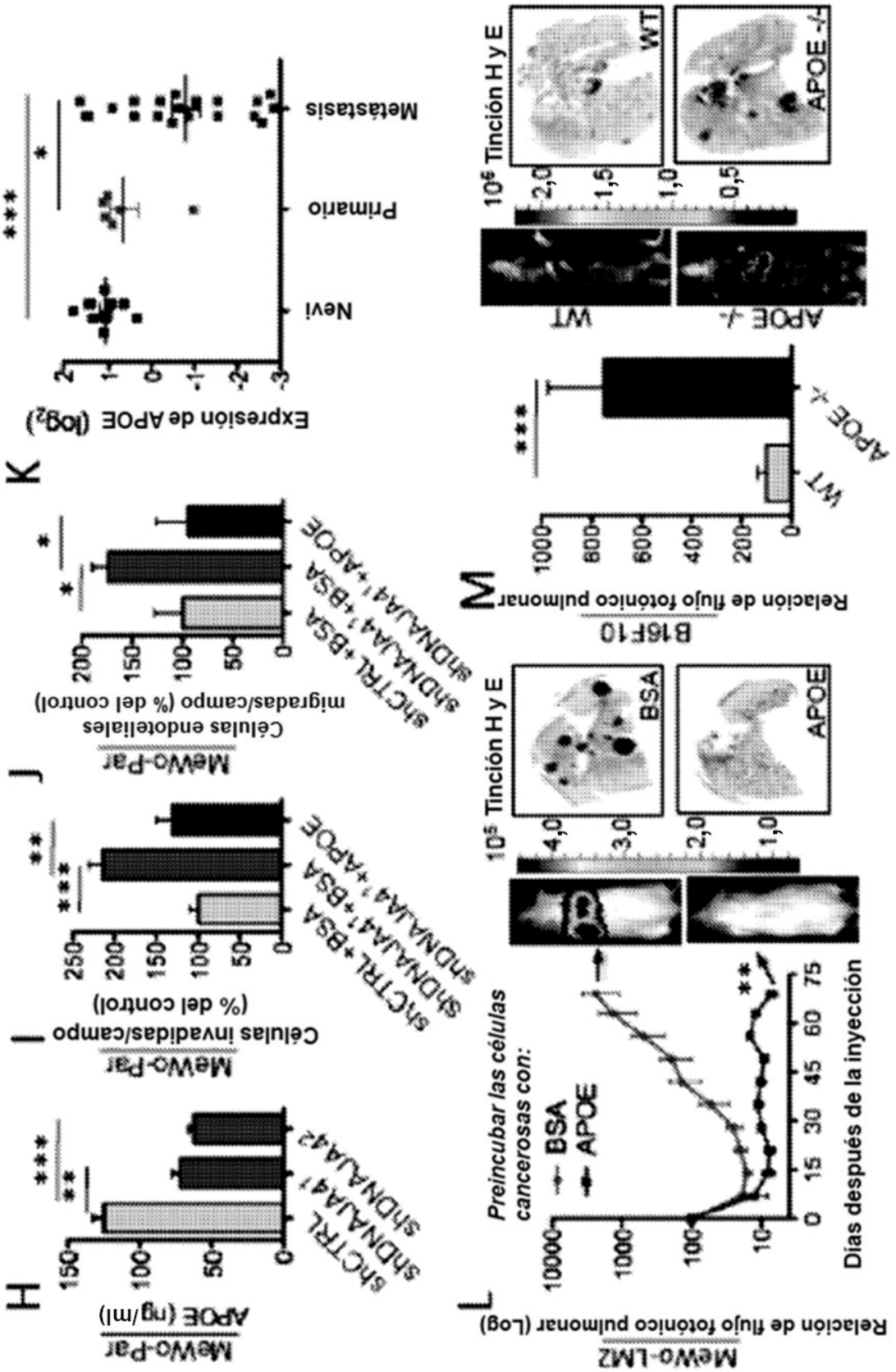
FIGURAS 4A-F


G
MeWo-Par
Células invadidas/campo (% del control)
CTRL
APOE DNAJA4
m1908 OE
H
MeWo-Par
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
I
A375-LM3
Células invadidas/campo (% del control)
shCTRL
shAPOE
shDNAJA4
CTRL 3 miARN KD
J
A375-LM3
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
3 miARN KD
CTRL
shCTRL
shAPOE
+shDNAJA4
K
MeWo-LM2
Porcentaje acumulativo
m1908KD + shCTRL
m1908KD + shAPOE1
m1908KD + shAPOE2
P=0,007
P<0,0001
m1908KD + shCTRL
m1908KD + shDNAJA41
m1908KD + shDNAJA42
P<0,0001
P<0,001
Densidad de vasos sanguineos % (Log)
Vimentina/Meca32
shCTRL
shAPOE1
shDNAJA42
Meca32

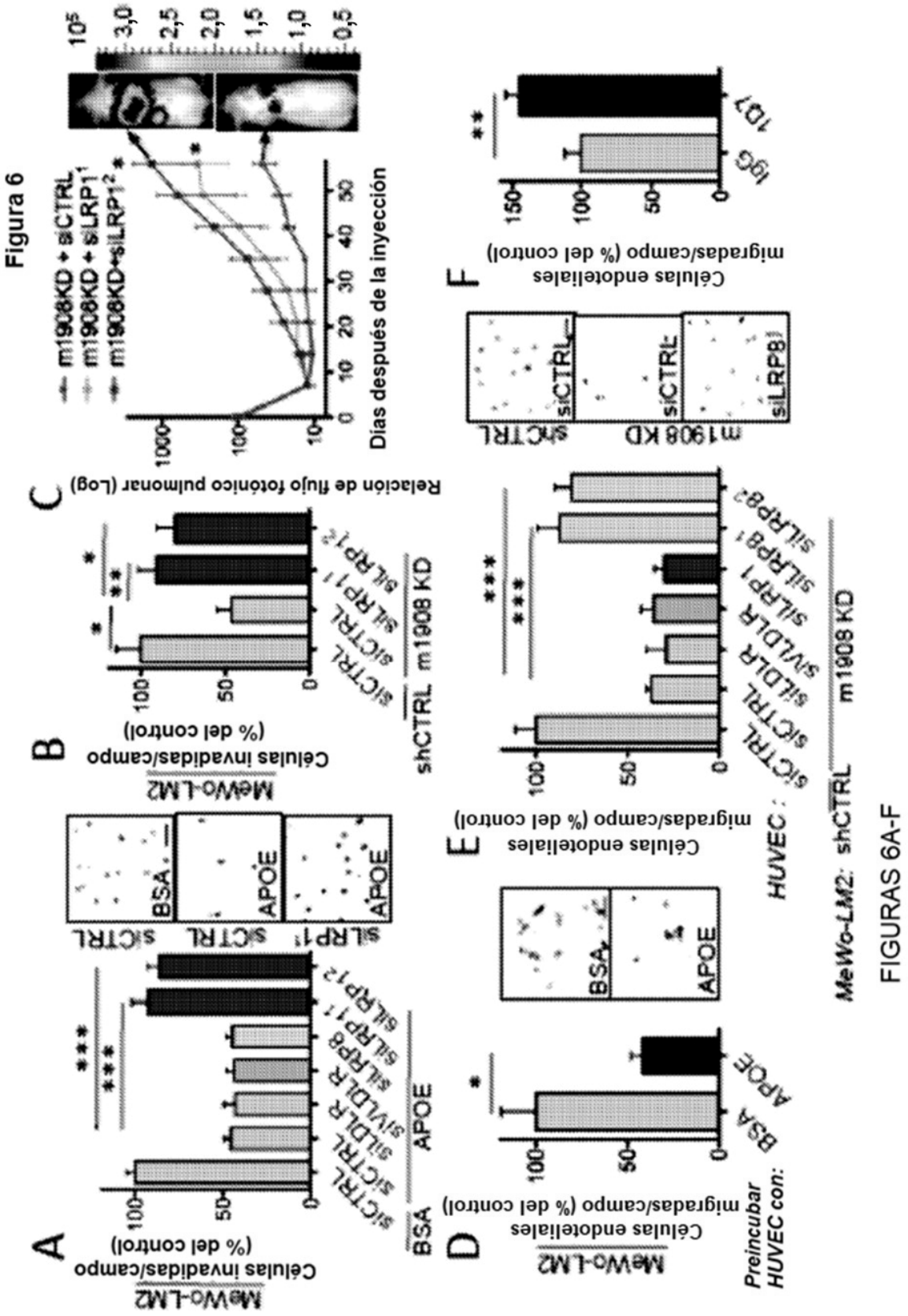
FIGURAS 4G-K


A
APOE (ng/ml)
MeWo-Par
MeWo-LM2
B
MeWo-LM2
shCTRL
m1993aSp KD
m1908 KD
C
MeWo-Par
Células invadidas/campo (% del control)
APOE Ac: 1D7
IgG
5 µg/ml
10 µg/ml
20 µg/ml
40 µg/ml
D
MeWo-Par
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
1D7 (40 µg/ml)
IgG
IgG
1D7: 10µg
1D7: 40µg
E
MeWo-LM2
Células/campo (% del control)
Invasión
Reclutamiento endotelial
BSA
APOE
F
MeWo-LM2
Células invadidas/campo (% del control)
IgG
1D7
G
MeWo-LM2
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
IgG
1D7

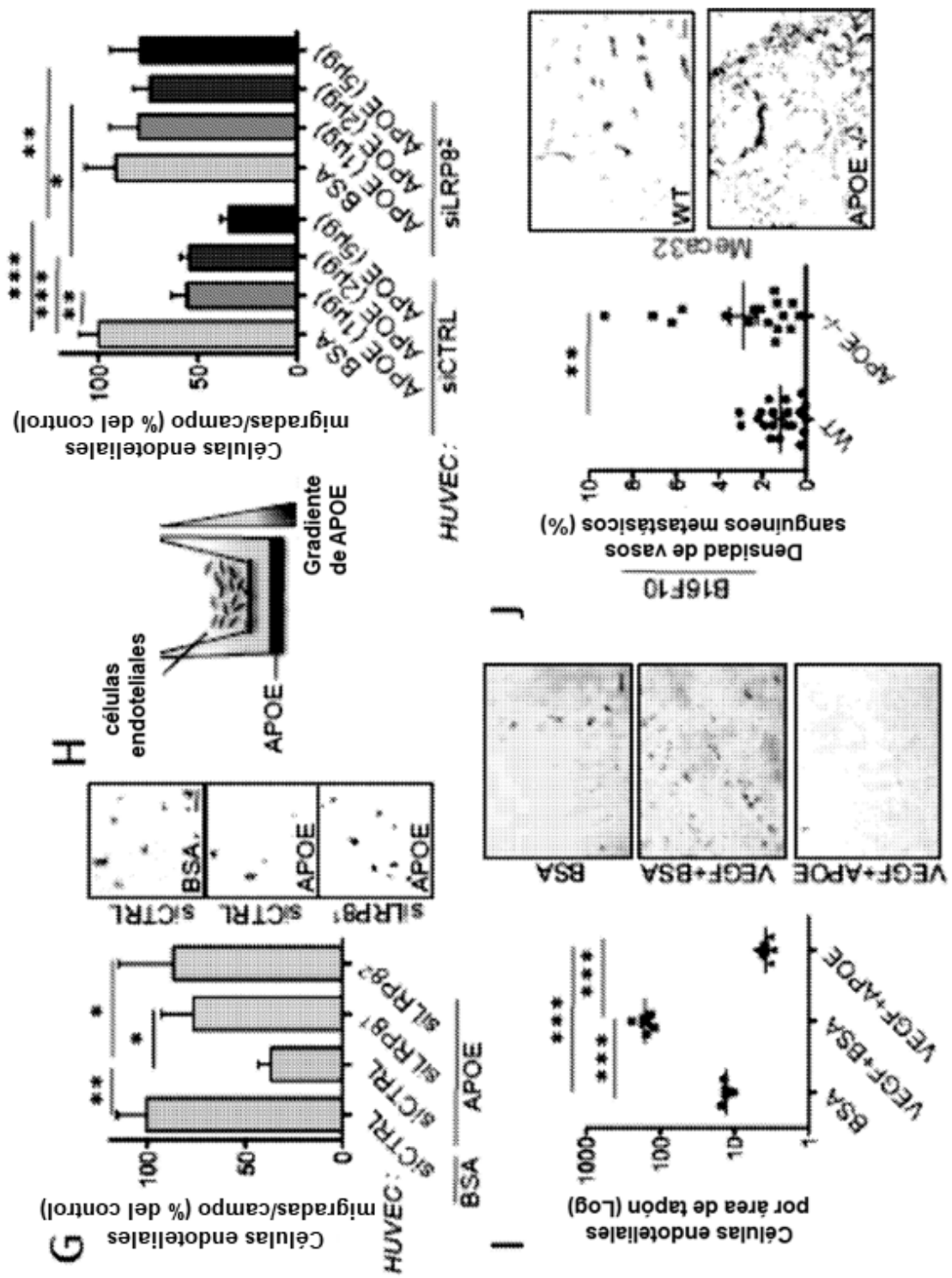
FIGURAS 5A-G


H
MeWo-Par
APOE (ng/ml)
shCTRL
shDNAJA4 ;
shDNAJA42
I
MeWo-Par
Células invadidas/campo
(% del control)
shCTRL +BSA
shDNAJA4 ;+BSA
shDNAJA4 ;+APOE
J
MeWo-Par
Células endoteliales
migradas/campo (% del control)
shCTRL +BSA
shDNAJA4 ;+BSA
shDNAJA4 ;+APOE
K
Expresión de APOE (log2)
Nevi
Primario
Metástasis
L
MeWo-LM2
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
Preincubar las células cancerosas con:
BSA
APOE
Días después de la inyección
10⁵ Tinción H y E
BSA
APOE
M
B16F10
Relación de flujo fotónico pulmonar
WT
APOE -/-
10⁶ Tinción H y E
WT
APOE -/-

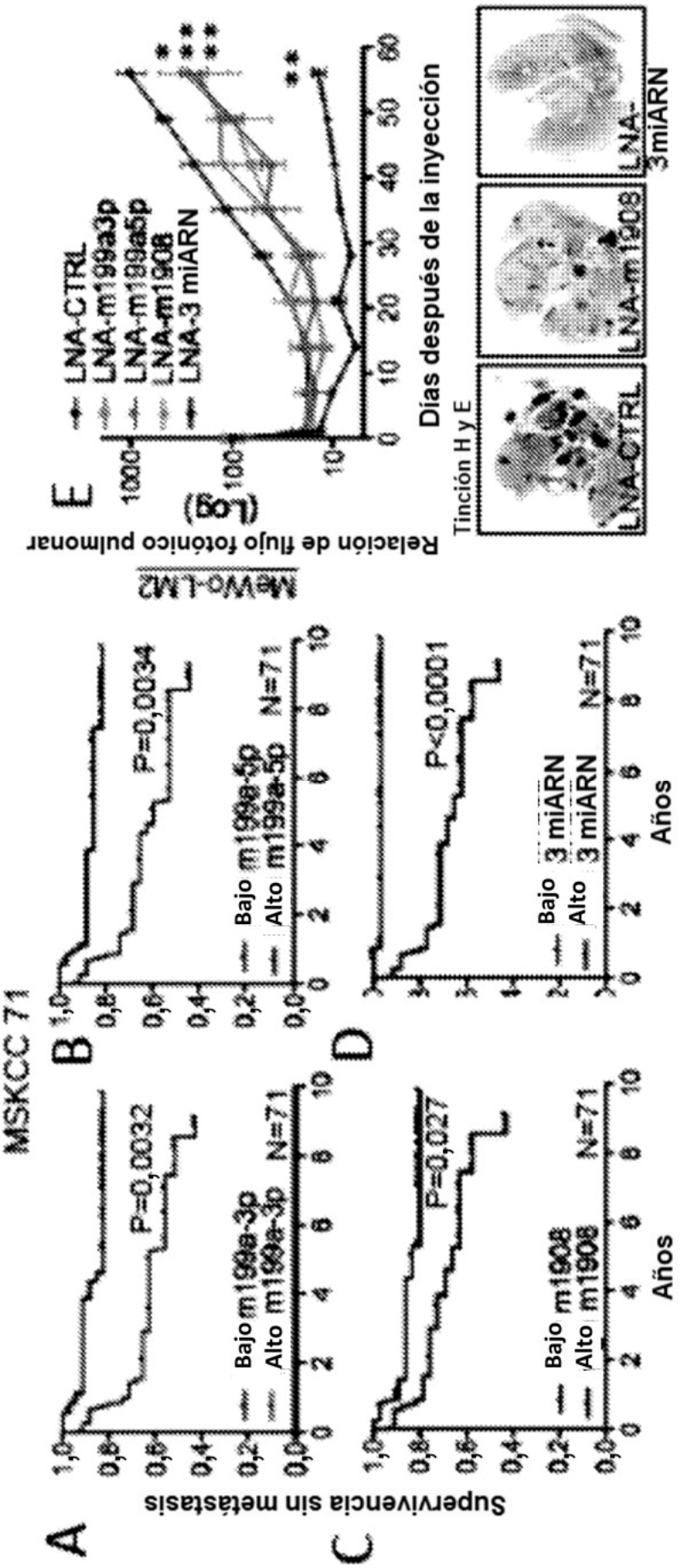
FIGURAS 5H-M


Figura 6
A
Células invadidas/campo (% del control)
MeWo-LM2
BSA
APOE
siCTRL
siLDLR
siVLDLR
siLRP8
siLRP1 1
siLRP1 2
siLRP1
B
Células invadidas/campo (% del control)
MeWo-LM2
shCTRL
m1908 KD
siCTRL
siLRP1 1
siLRP1 2
C
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
Días después de la inyección
m1908KD + siCTRL
m1908KD + siLRP1 1
m1908KD+siLRP1 2
D
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
MeWo-LM2
Preincubar HUVEC con:
BSA
APOE
E
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
HUVEC :
MeWo-LM2: shCTRL
m1908 KD
siCTRL
siLDLR
siVLDLR
siLRP1
siLRP8 1
siLRP8 2
F
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
m1908 KD
siCTRL
siLRP8 1
IgG
1D7

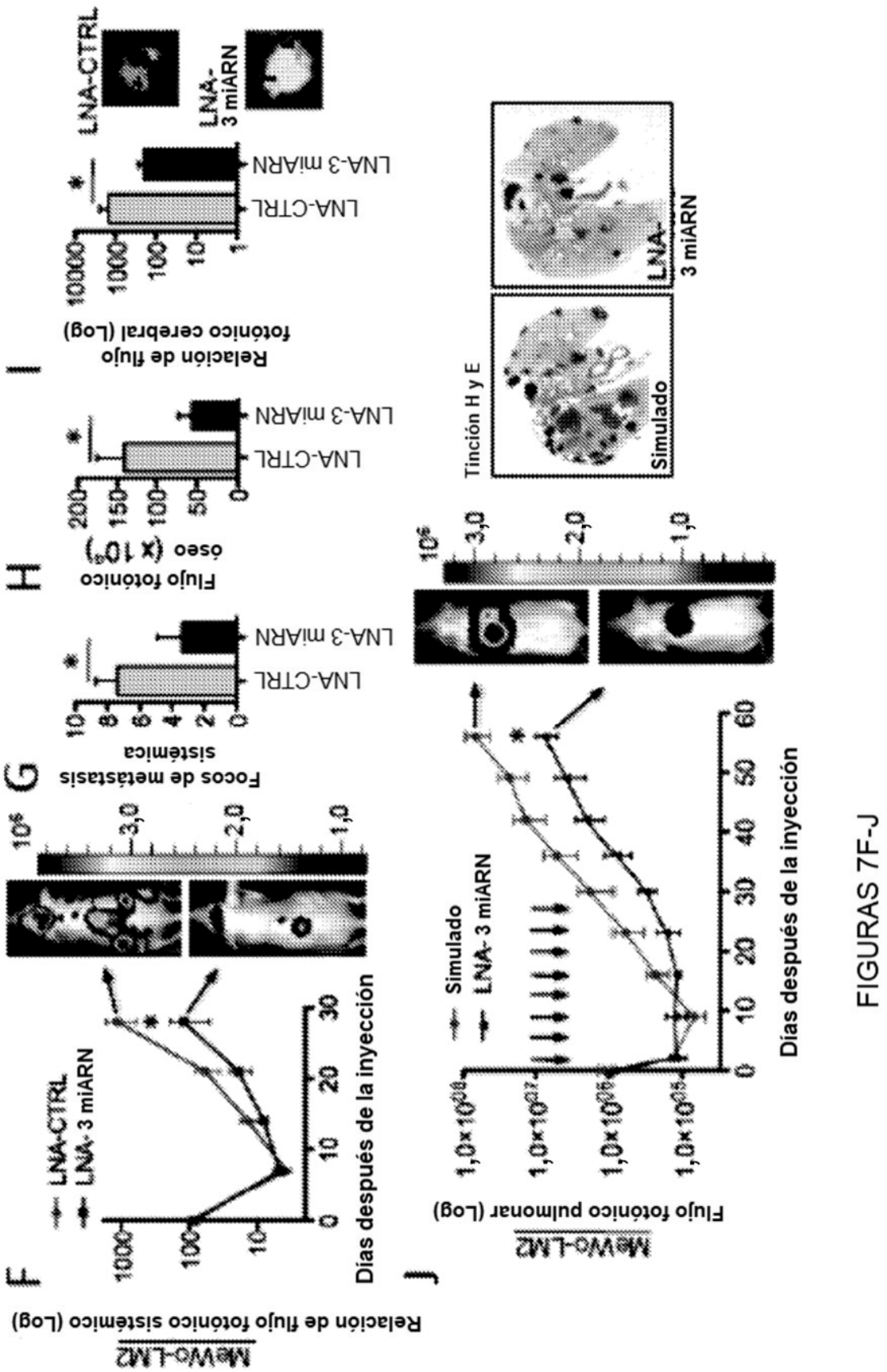
FIGURAS 6A-F


G
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
HUVEC:
BSA
APOE
siCTRL
siLRP8¹
siLRP8²
siCTRL
siLRP8¹
siLRP8²
BSA
APOE
H
células endoteliales
APOE
Gradiente de APOE
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
HUVEC:
siCTRL
siLRP8²
BSA
APOE (1µg)
APOE (2µg)
APOE (5µg)
I
Células endoteliales por área de tapón (Log)
BSA
VEGF+BSA
VEGF+APOE
VEGF+APOE
VEGF+BSA
BSA
J
B16F10
Densidad de vasos sanguíneos metastásicos (%)
WT
APOE -/-
Me ca32
WT
APOE -/-

FIGURAS 6G-J


A
MSKCC 71
Supervivencia sin metástasis
P=0,0032
Bajo m199a-3p
Alto m199a-3p
N=71
Años
B
P=0,0034
Bajo m199a-5p
Alto m199a-5p
N=71
C
P=0,027
Bajo m1908
Alto m1908
N=71
D
P<0,0001
Bajo 3 miARN
Alto 3 miARN
N=71
E
LNA-CTRL
LNA-m199a3p
LNA-m199a5p
LNA-m1908
LNA-3 miARN
Relación de flujo fotónico pulmonar
Días después de la inyección
Tinción H y E
LNA-CTRL
LNA-m1908
LNA-3miARN

FIGURAS 7A-E


F
Relación de flujo fotónico sistémico (Log)
MeWo-LM2
LNA-CTRL
LNA-3 miARN
Días después de la inyección
G
Focos de metástasis sistémica
LNA-CTRL
LNA-3 miARN
H
Flujo fotónico óseo
LNA-CTRL
LNA-3 miARN
I
Relación de flujo fotónico cerebral (Log)
LNA-CTRL
LNA-3 miARN
J
Tinción H y E
Simulado
LNA-3 miARN
Simulado
LNA-3 miARN
Flujo fotónico pulmonar (Log)
MeWo-LM2
Días después de la inyección

FIGURAS 7F-J

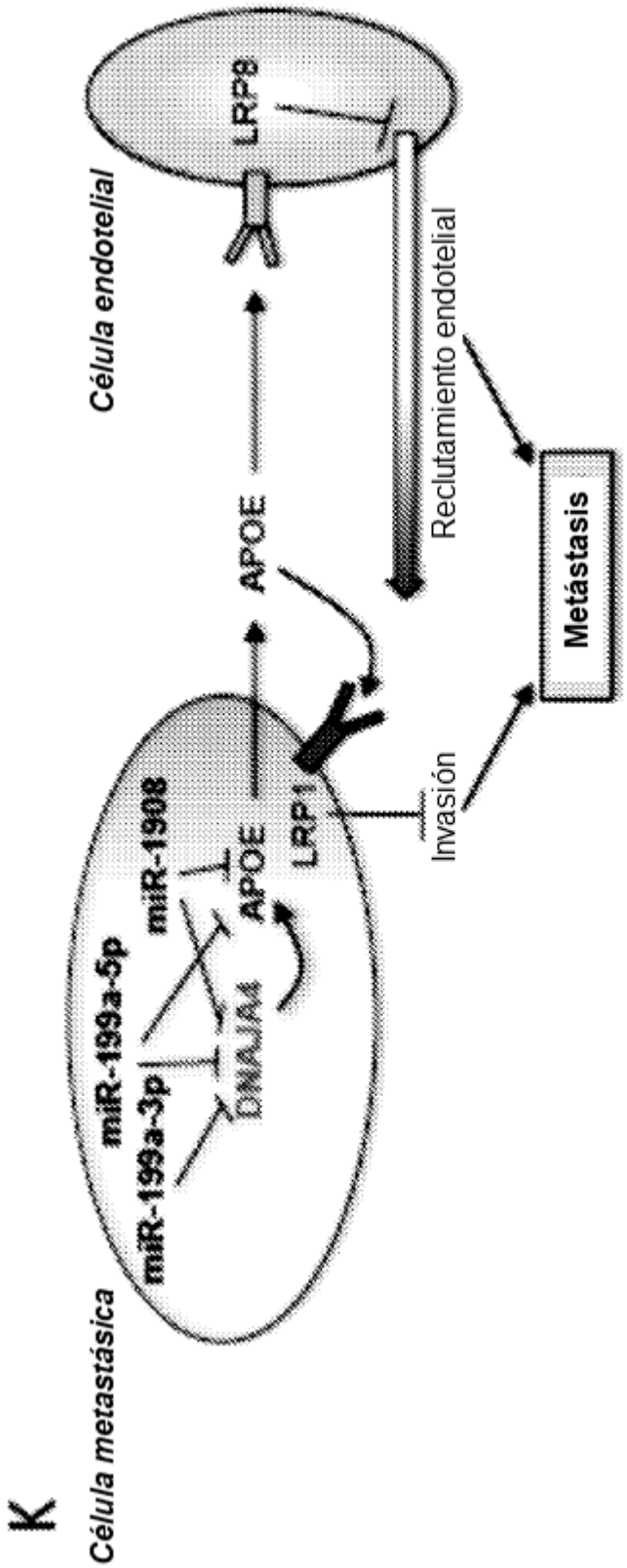
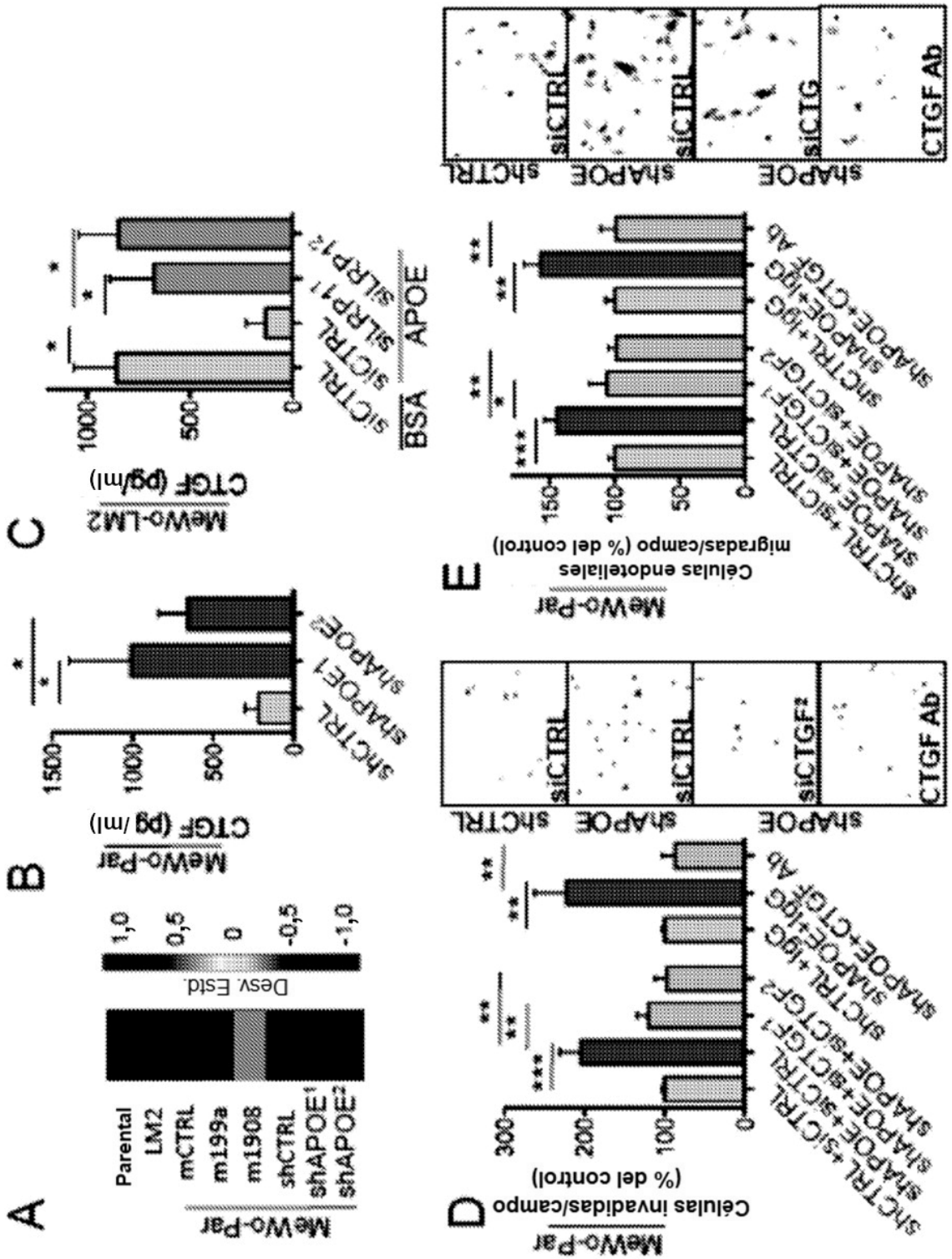
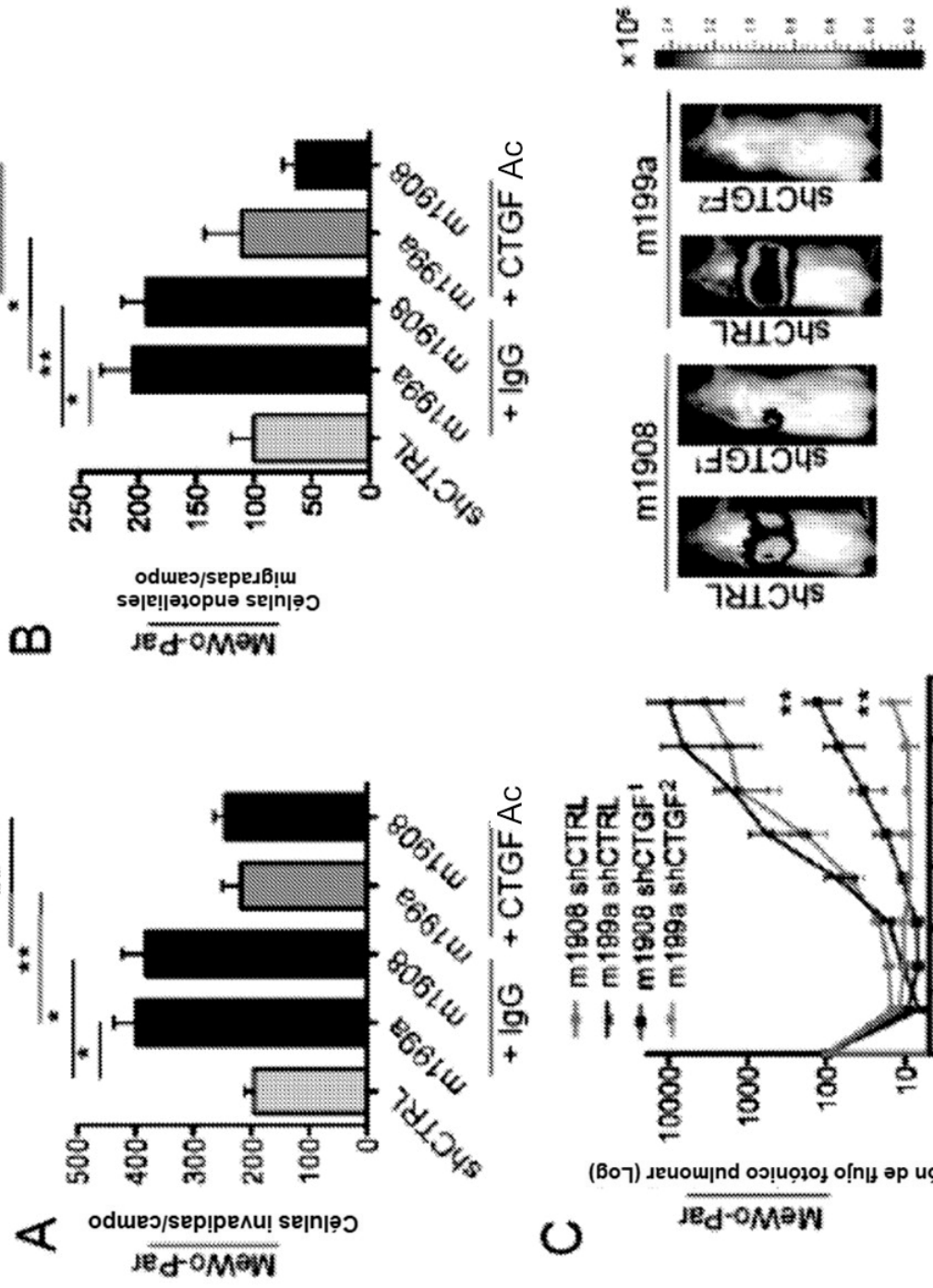

K
Célula metastásica
miR-199a-5p
miR-199a-3p
miR-1908
DNAJA4
APOE
LRP1
APOE
Célula endotelial
LRP8
Reclutamiento endotelial
Invasión
Metástasis

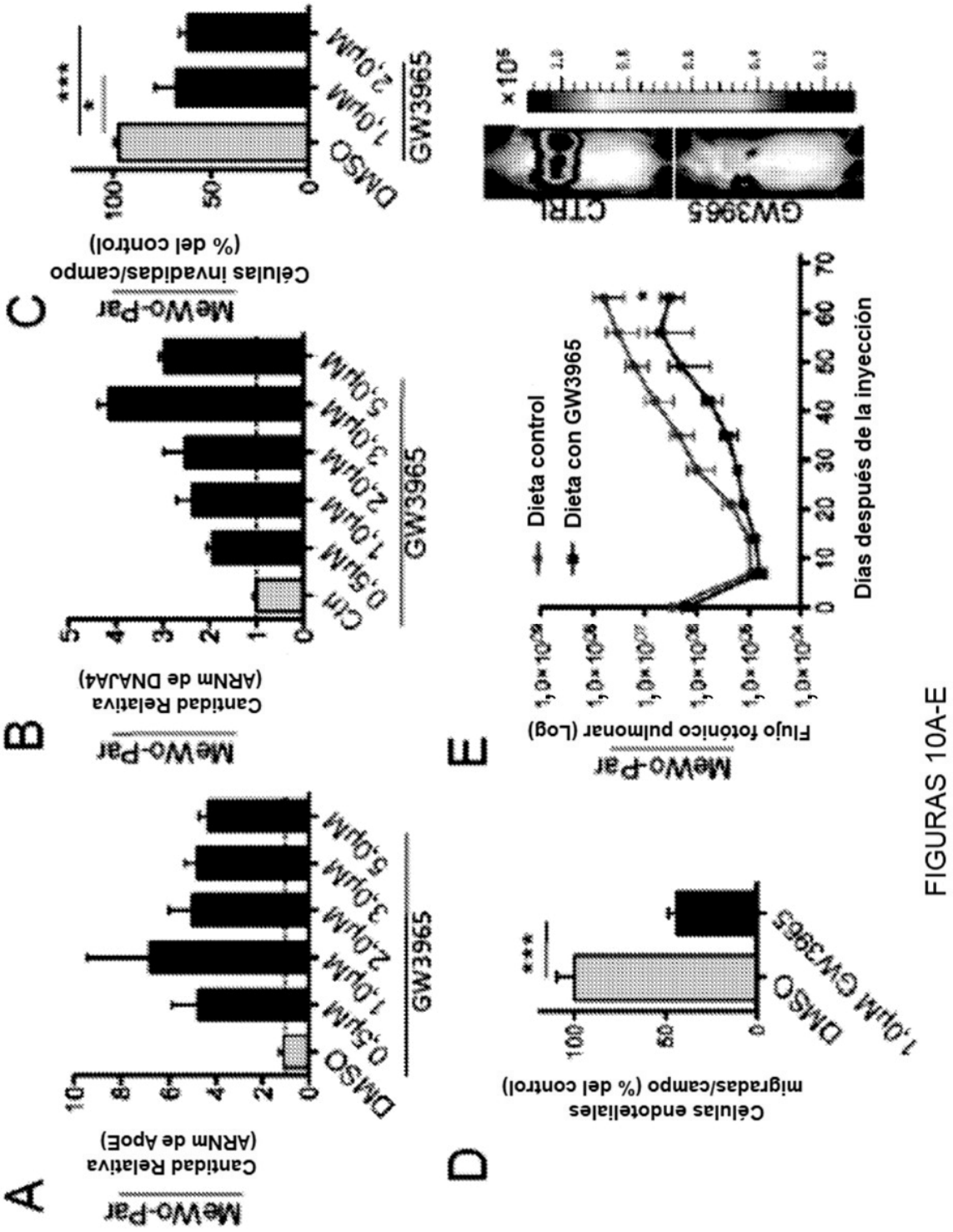
FIGURA 7K


A
MeWo-Par
Parental
LM2
mCTRL
m199a
m1908
shCTRL
shAPOE1
shAPOE2
Desv. Estd.
1,0
0,5
0
-0,5
-1,0
B
MeWo-Par
CTGF (pg/ml)
1500
1000
500
0
shCTRL
shAPOE1
shAPOE2
C
MeWo-LM2
CTGF (pg/ml)
1000
500
0
siCTRL
siLRP1
siLRP1/2
BSA
APOE
D
MeWo-Par
Células invadidas/campo (% del control)
300
200
100
0
shCTRL+siCTRL
shAPOE+siCTRL
shCTRL+siCTGF1
shAPOE+siCTGF1
shCTRL+IgG
shAPOE+IgG
shAPOE+CTGF Ab
shCTRL
shAPOE
siCTRL
siCTGF2
CTGF Ab
E
MeWo-Par
Células endoteliales migradas/campo (% del control)
150
100
50
0
shCTRL+siCTRL
shAPOE+siCTRL
shCTRL+siCTGF1
shAPOE+siCTGF1
shCTRL+IgG
shAPOE+IgG
shAPOE+CTGF Ab
shCTRL
shAPOE
siCTRL
siCTG
CTGF Ab

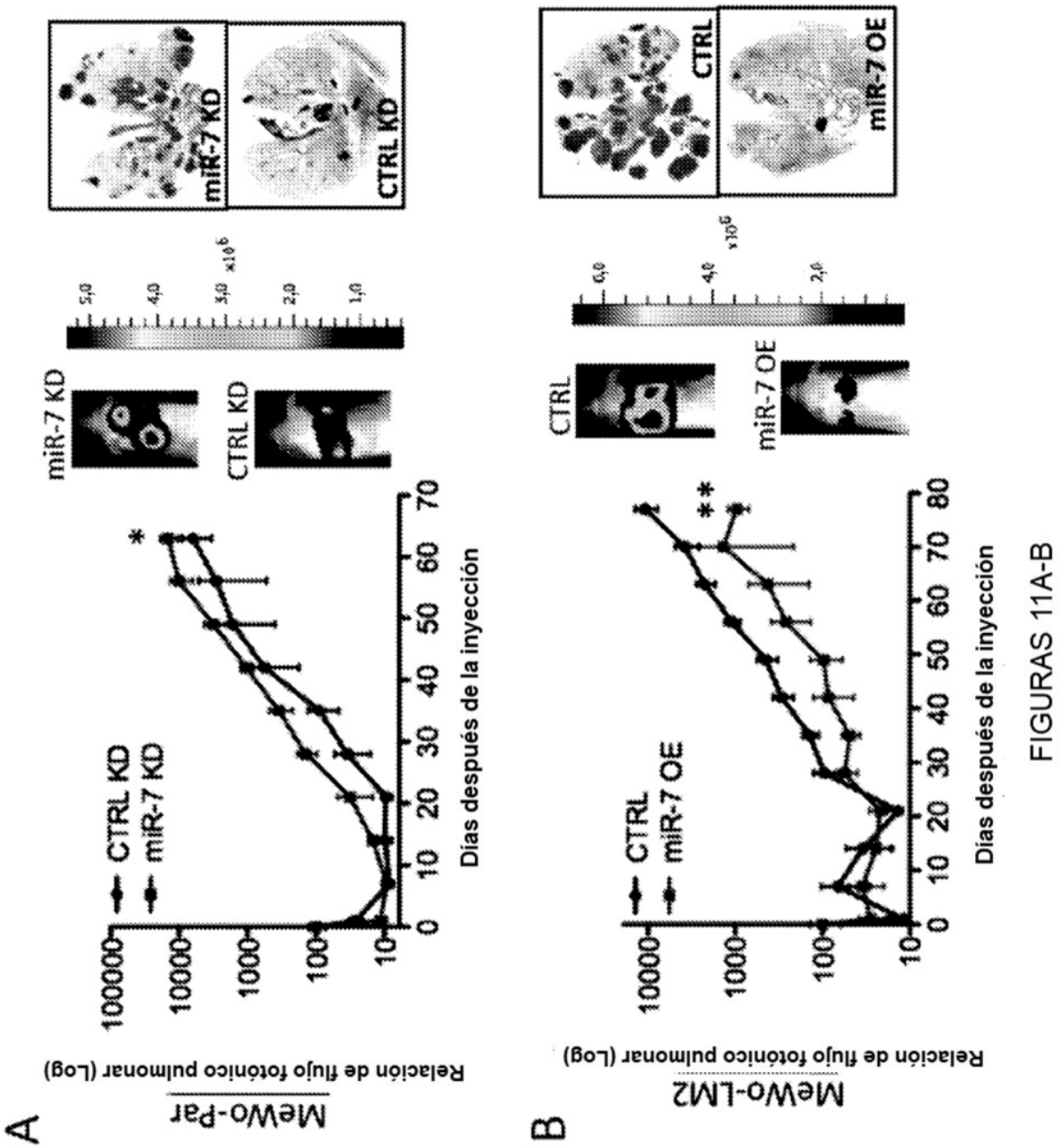
FIGURAS 8A-E


A
MeWo-Par
Células invadidas/campo
shCTRL
m1992a
m1908
m1992a
m1908
+ IgG
+ CTGF Ac
B
MeWo-Par
Células endoteliales migradas/campo
C
MeWo-Par
Relación de flujo fotónico pulmonar (Log)
m1908 shCTRL
m199a shCTRL
m1908 shCTGF1
m199a shCTGF2
Días después de la inyección
m1908
m199a
shCTRL
shCTGF1
shCTGF2

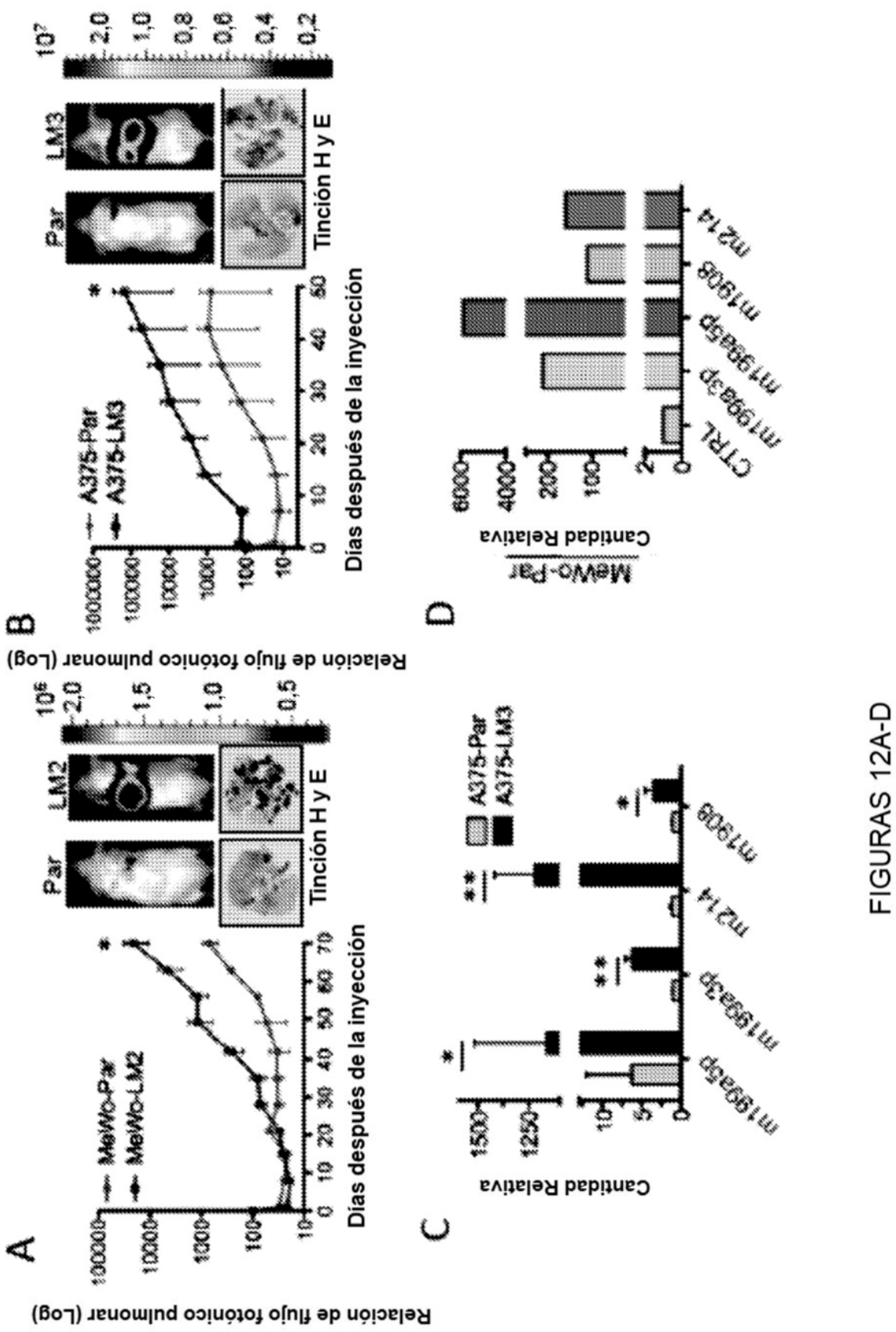
FIGURAS 9A-C



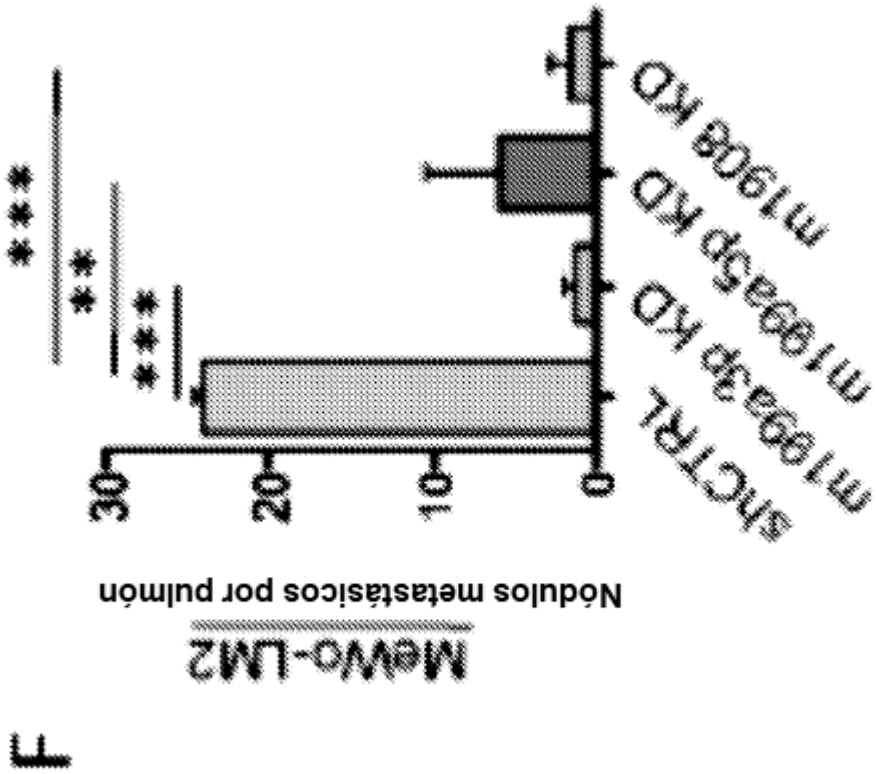
FIGURAS 10A-E



FIGURAS 11A-B



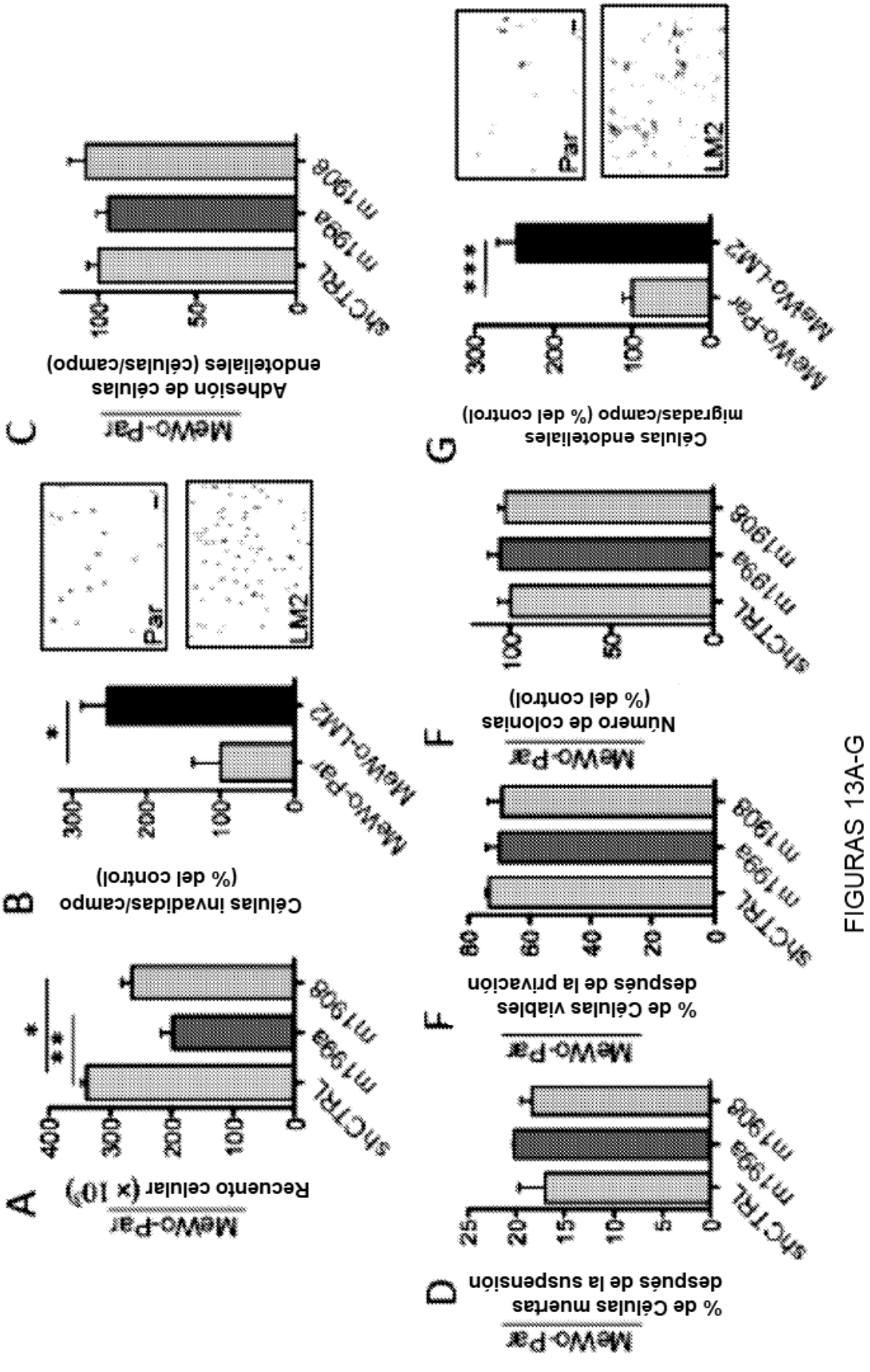
FIGURAS 12A-D



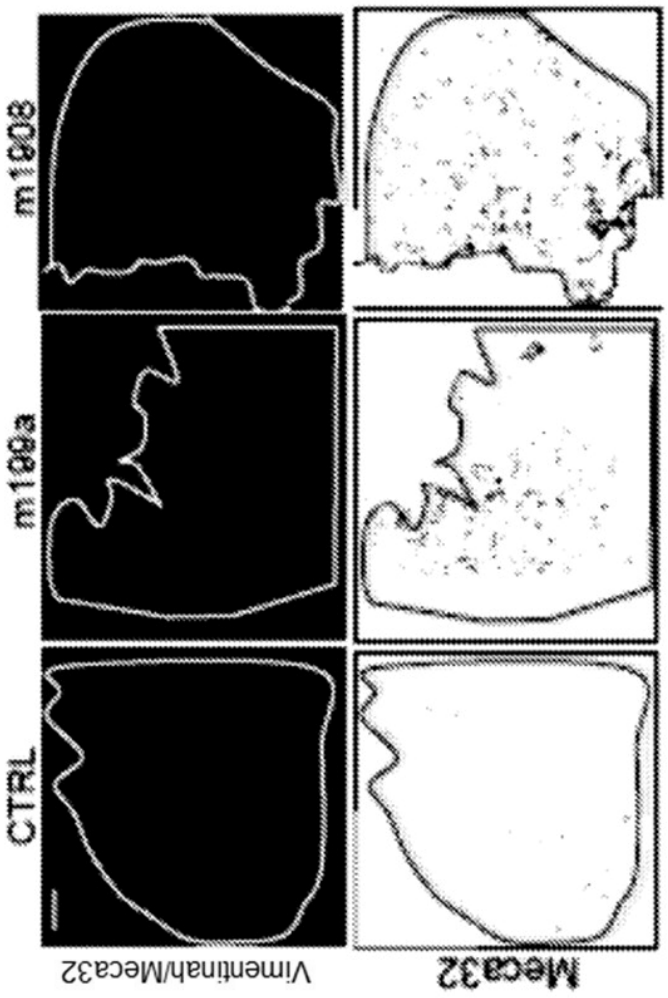
E

F

FIGURAS 12E-F



FIGURAS 13A-G


CTRL
m199a
m1908
Vimentina/Meca32
Meca32

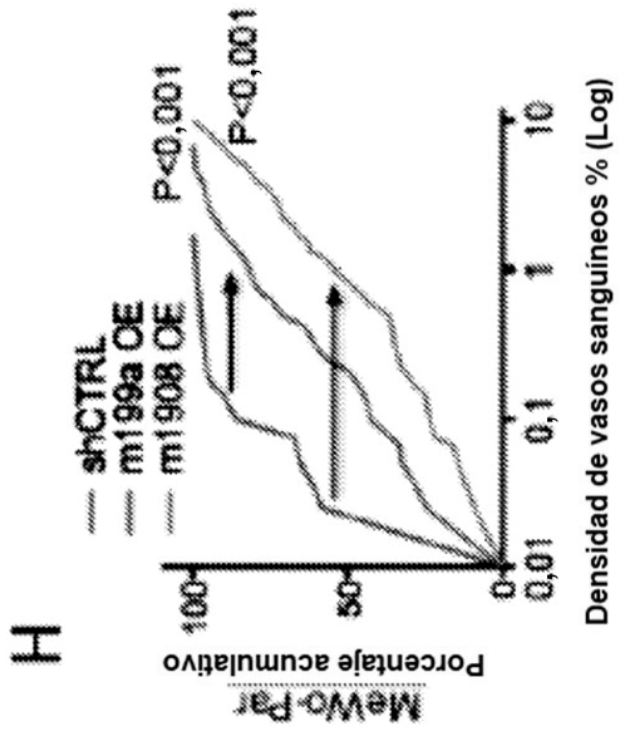
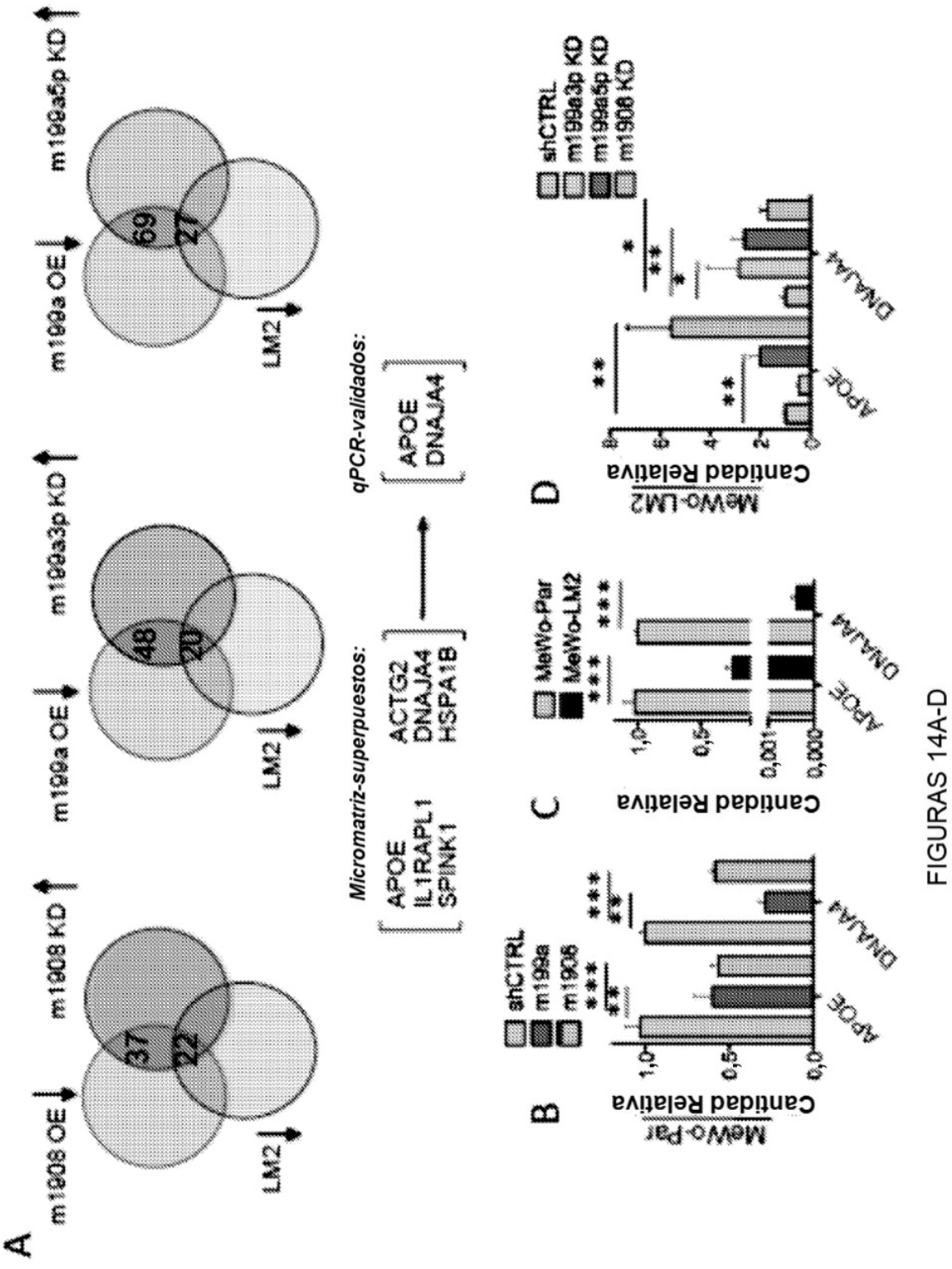
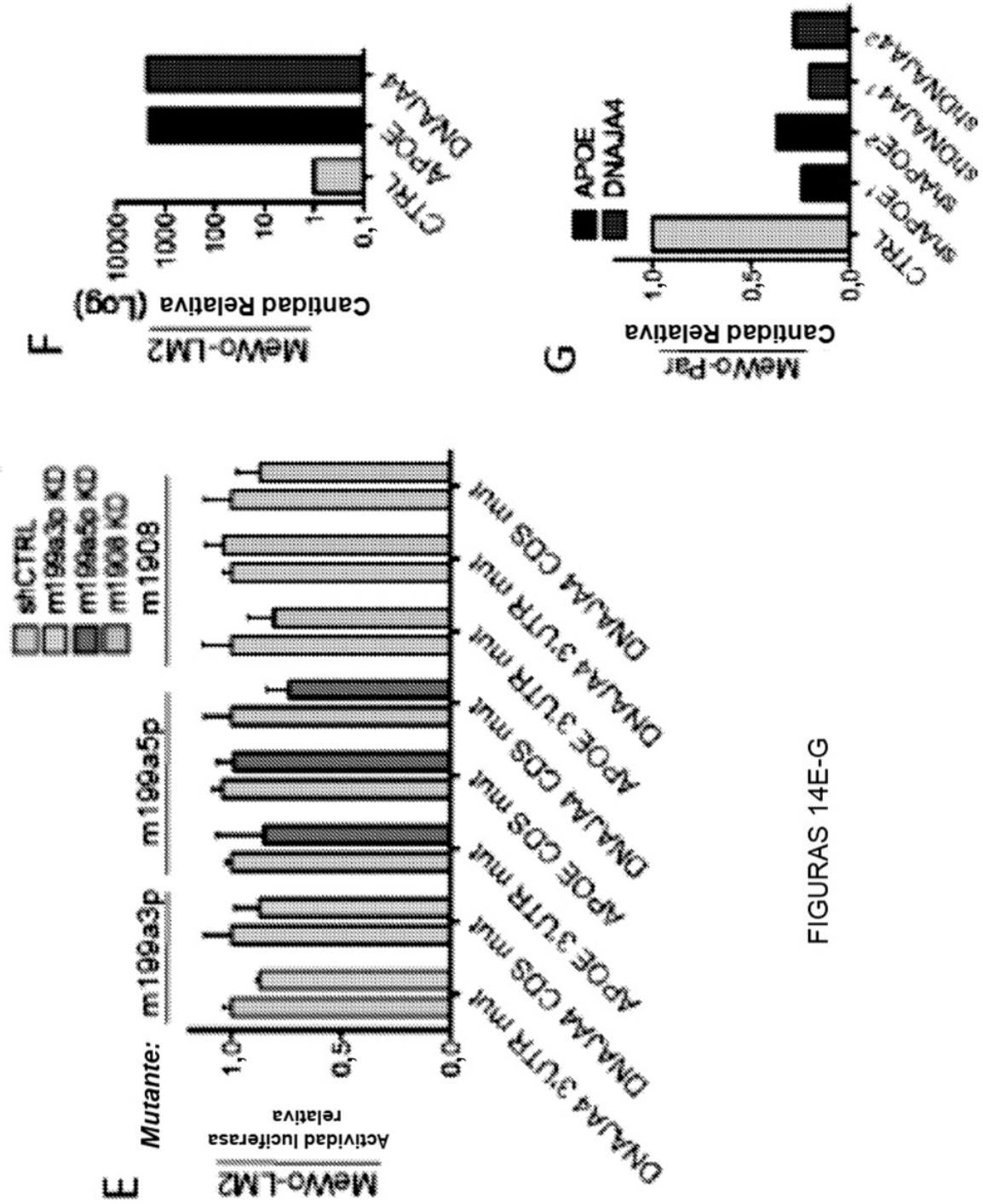

H
MeWo-Par
Porcentaje acumulativo
100
50
0
shCTRL
m199a OE
m1908 OE
P<0,001
P<0,001
0,01
0,1
1
10
Densidad de vasos sanguíneos % (Log)

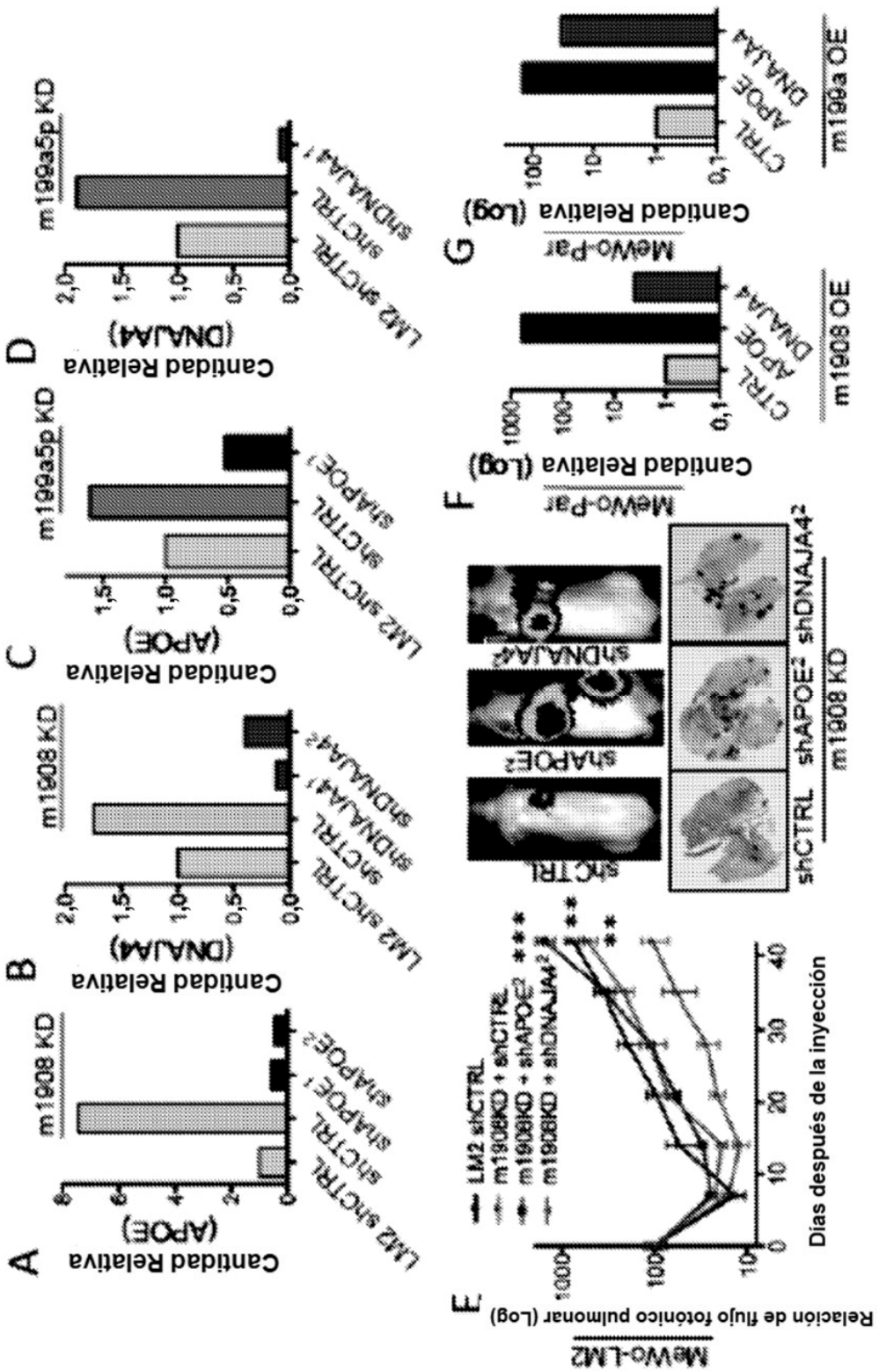
FIGURA 13H



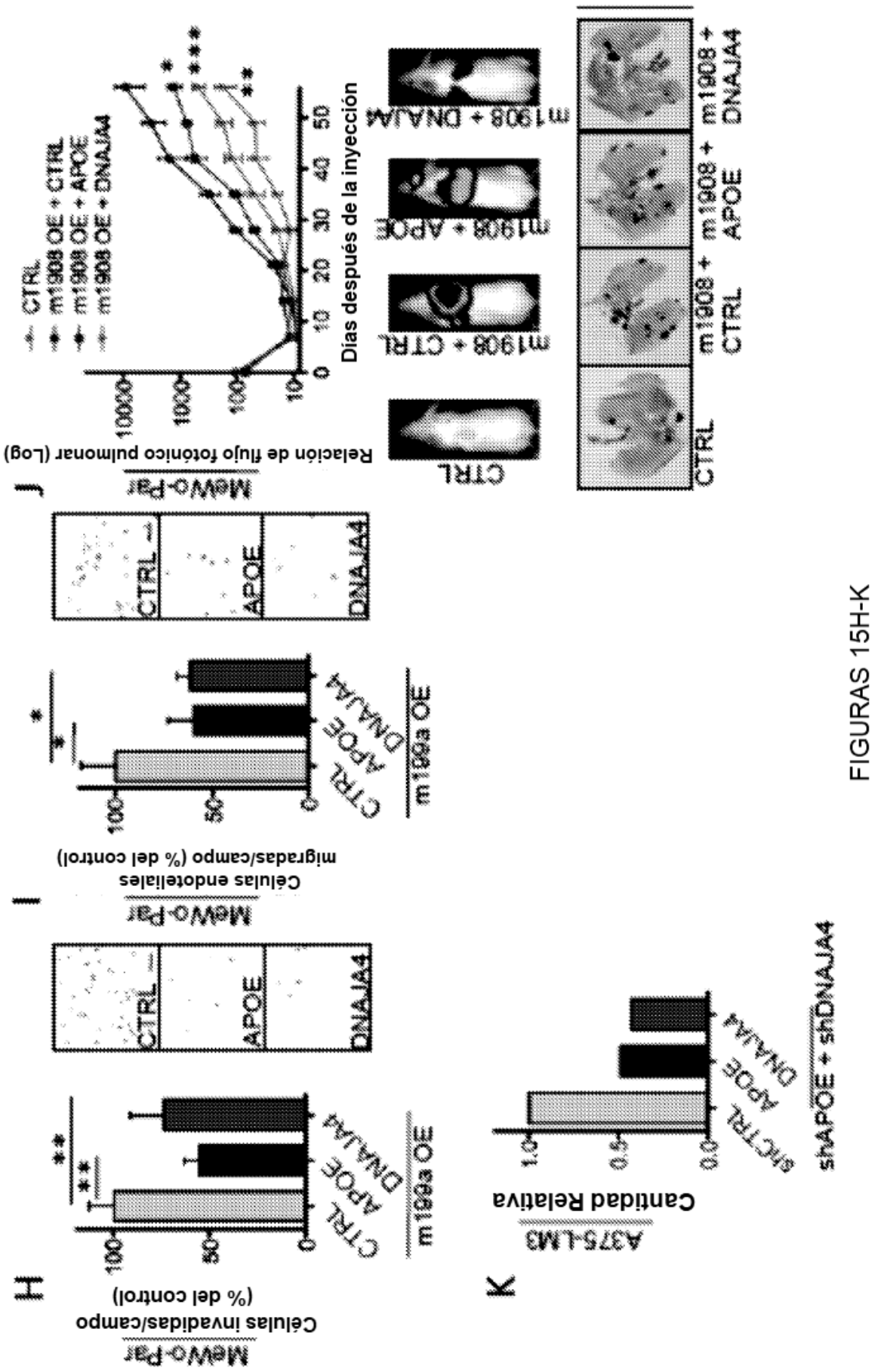
FIGURAS 14A-D



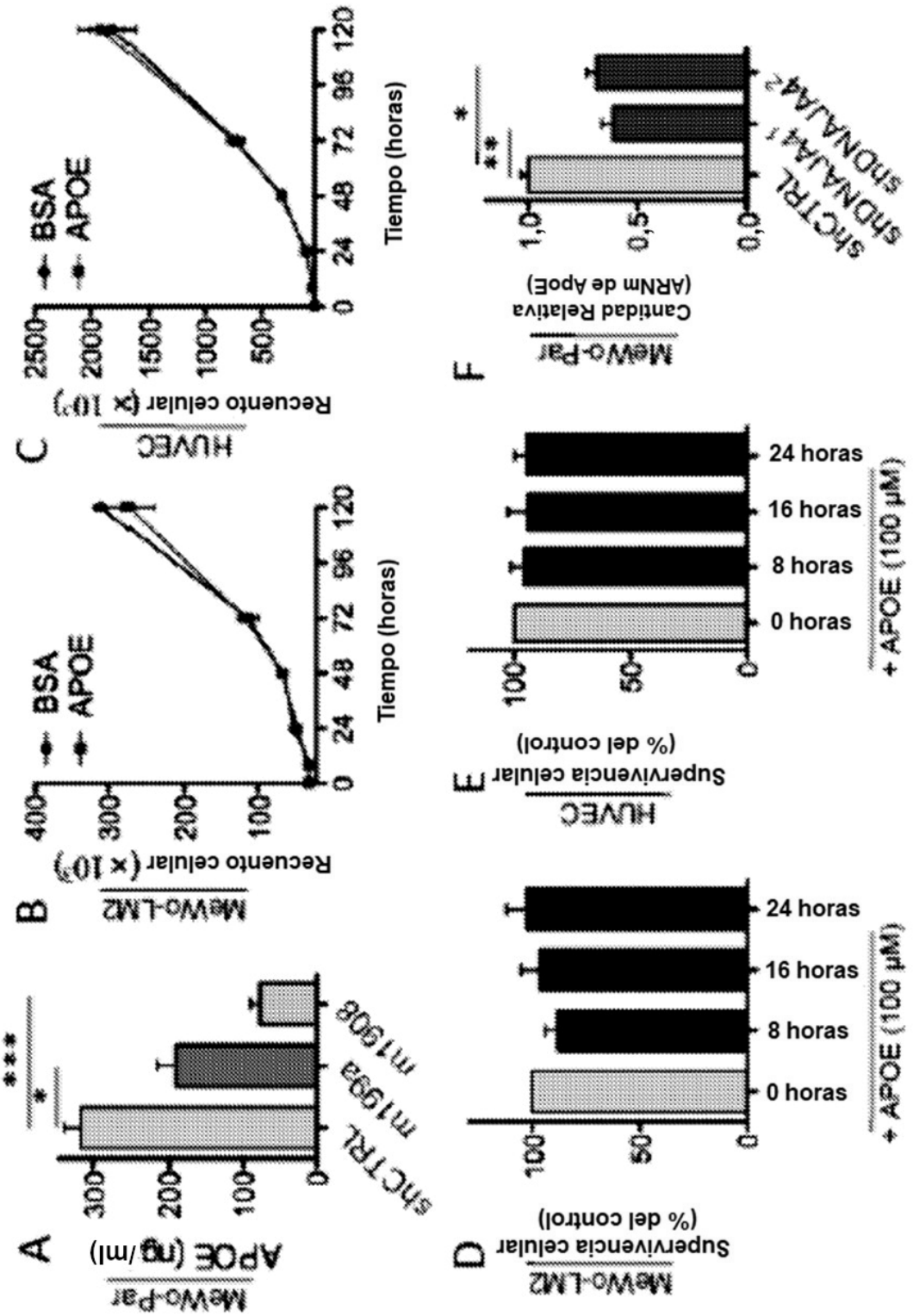
FIGURAS 14E-G



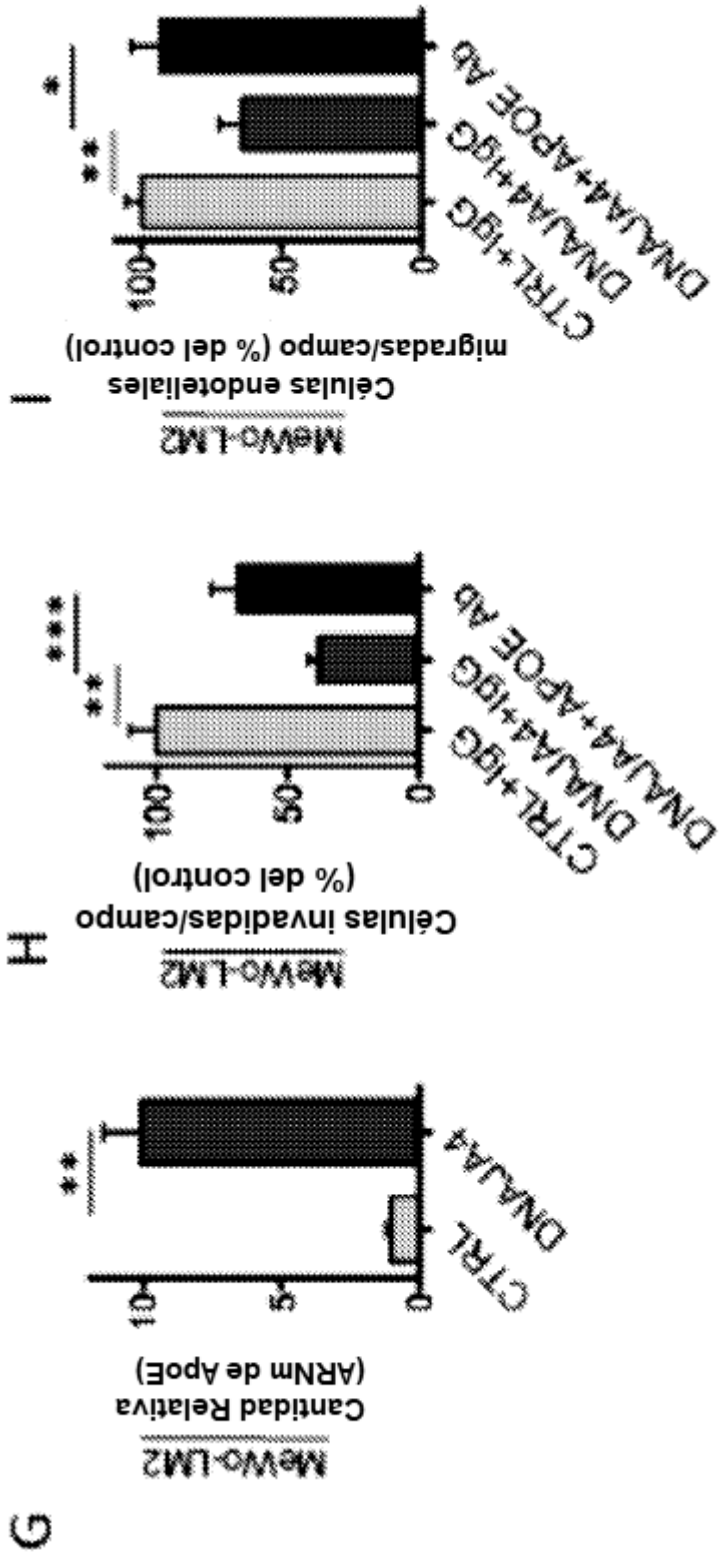
FIGURAS 15A-G



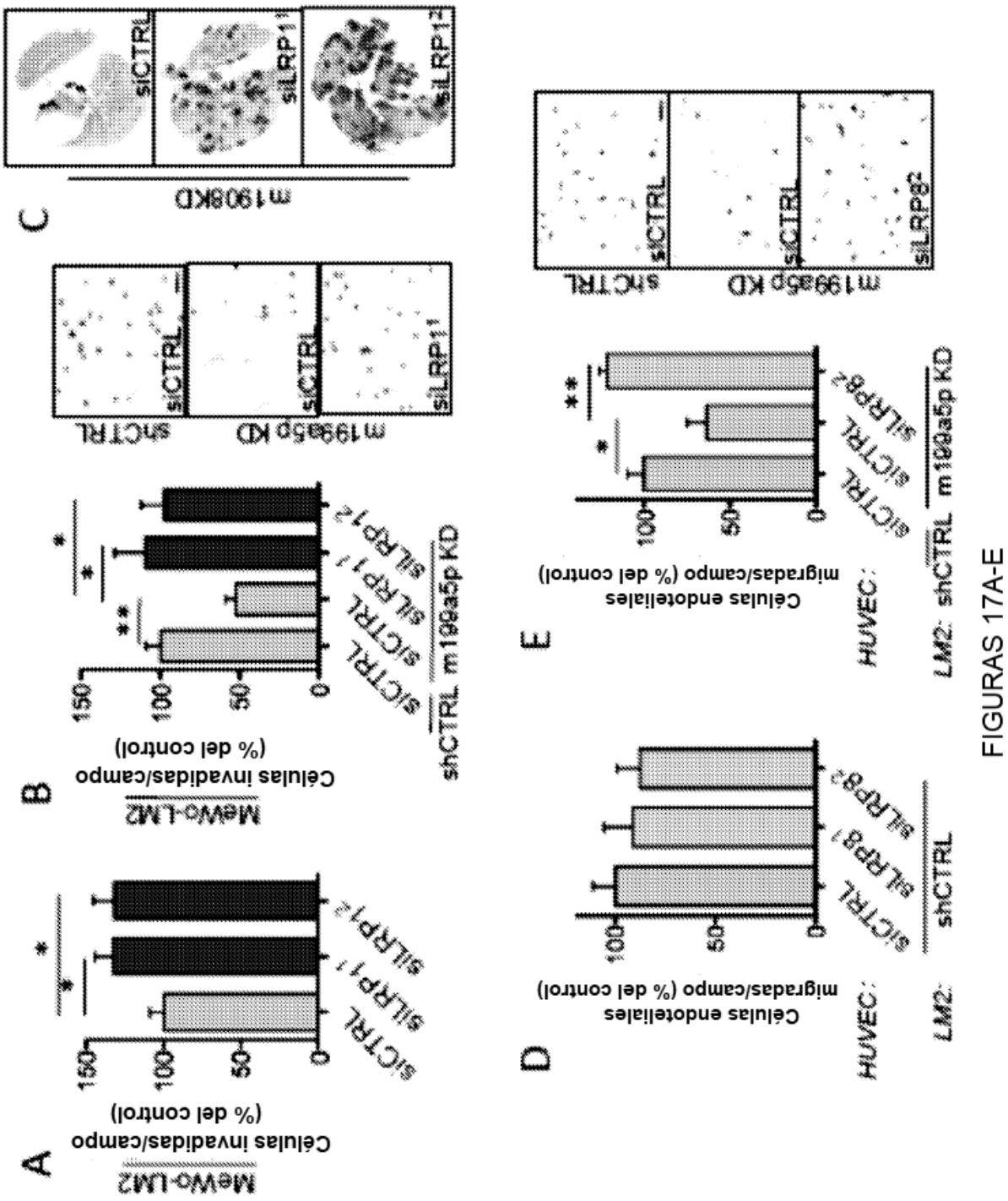
FIGURAS 15H-K



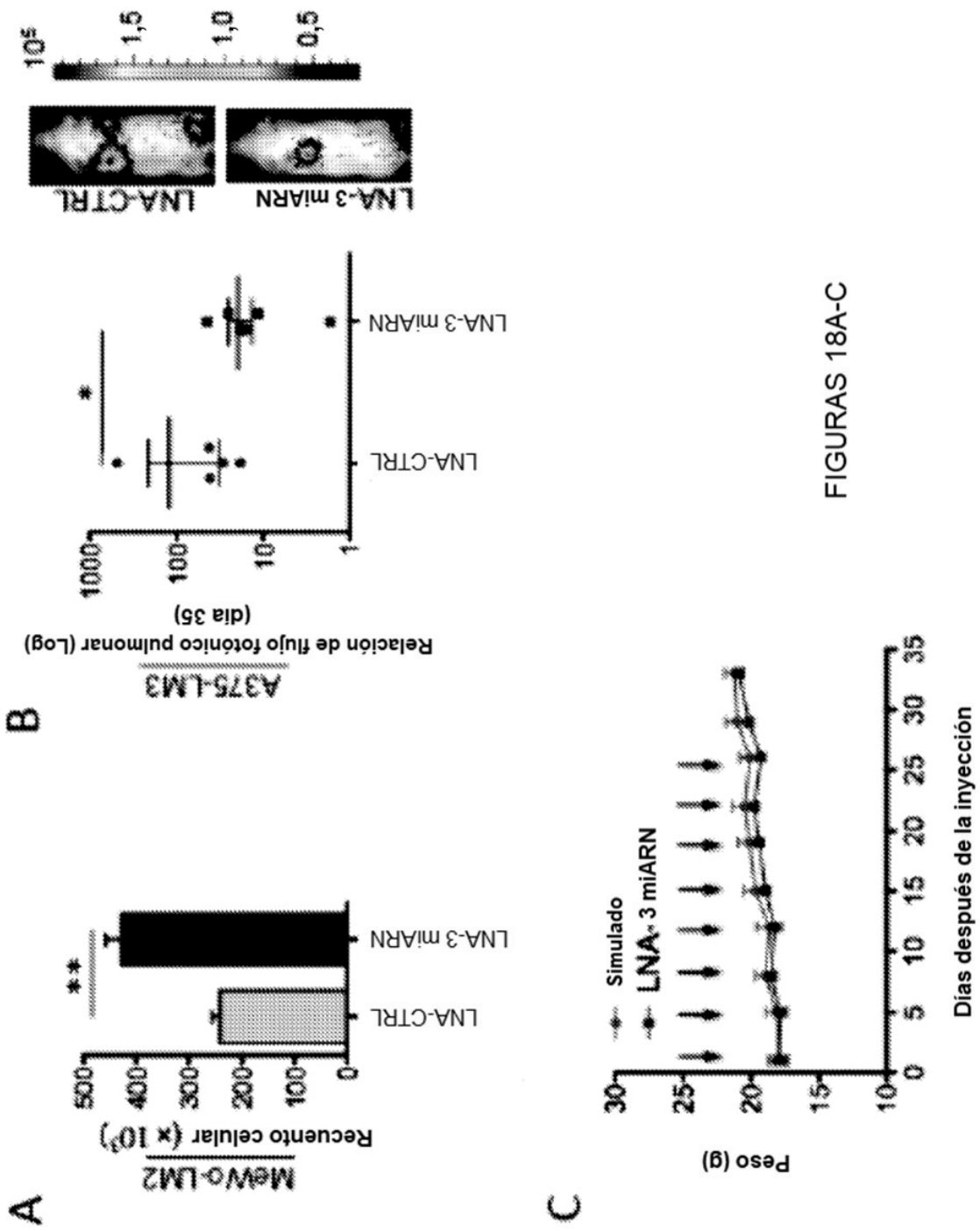
FIGURAS 16A-F



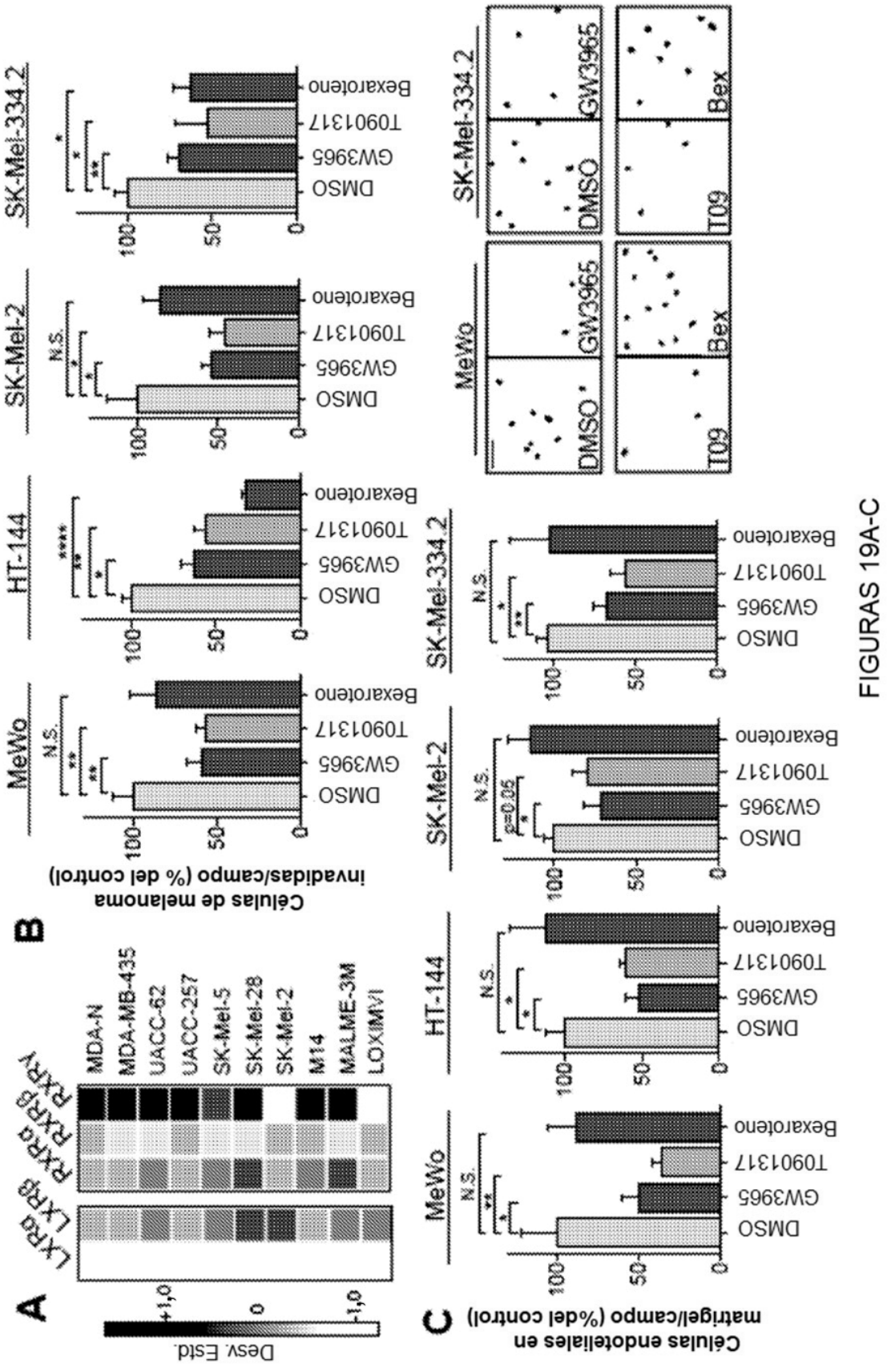
FIGURAS 16G-I



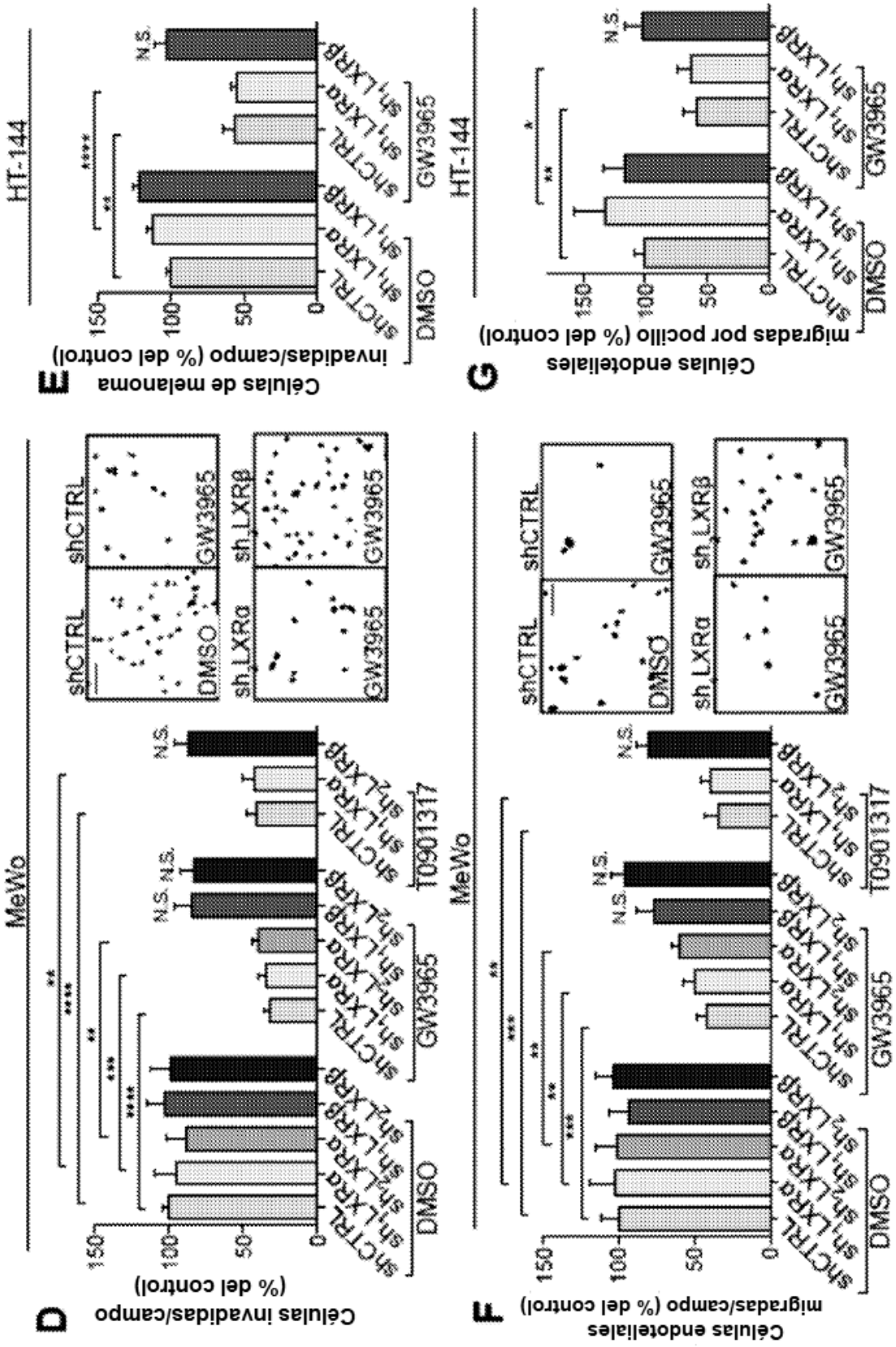
FIGURAS 17A-E



FIGURAS 18A-C



FIGURAS 19A-C



FIGURAS 19D-F

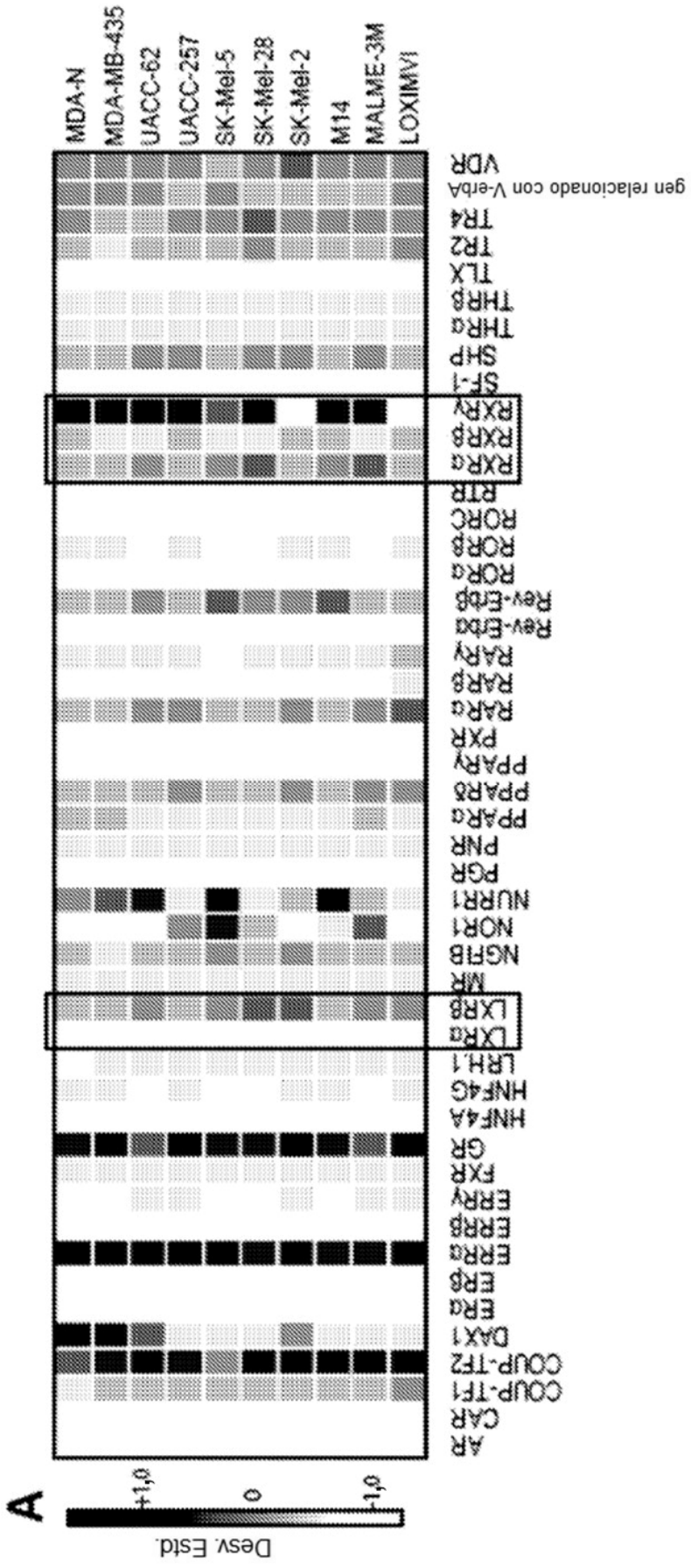
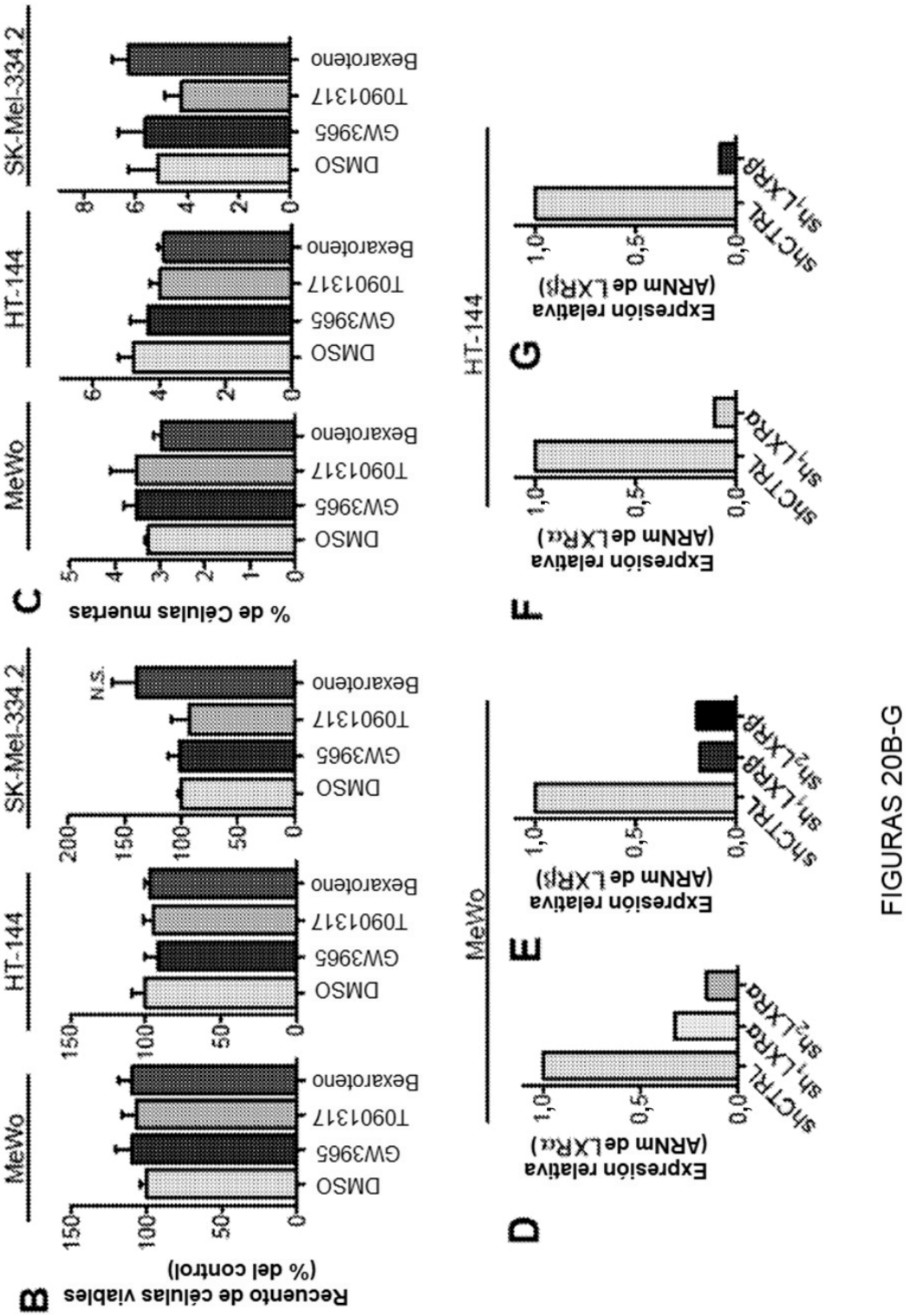
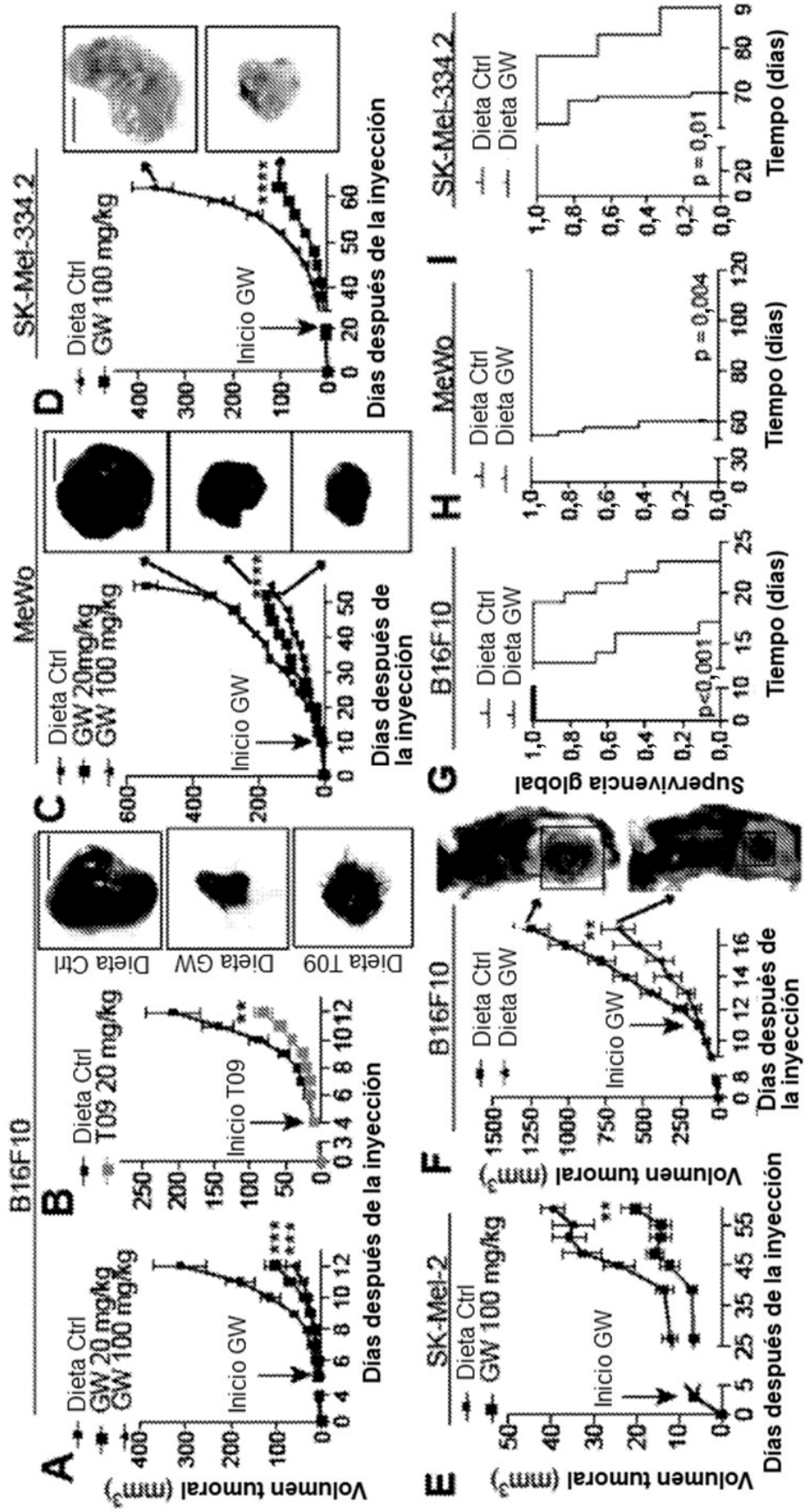

A
Desv. Estd.
+1,0
0
-1,0
MDA-N
MDA-MB-435
UACC-62
UACC-257
SK-Mel-5
SK-Mel-28
SK-Mel-2
M14
MALME-3M
LOXIMVI
AR
CAR
COUP-TF1
COUP-TF2
DAX1
ERα
ERβ
ERRα
ERRβ
ERRγ
FXR
GR
HNF4A
HNF4G
LRH.1
LXRα
LXRβ
MR
NGFIB
NOR1
NURR1
PGR
PNR
PPARα
PPARδ
PPARγ
PXR
RARα
RARβ
RARγ
Rev-Erbα
Rev-Erbβ
RORα
RORβ
RORC
RTR
RXRα
RXRβ
RXRγ
SF-1
SHP
THRα
THRβ
TLX
TR2
TR4
gen relacionado con V-erbA
VDR

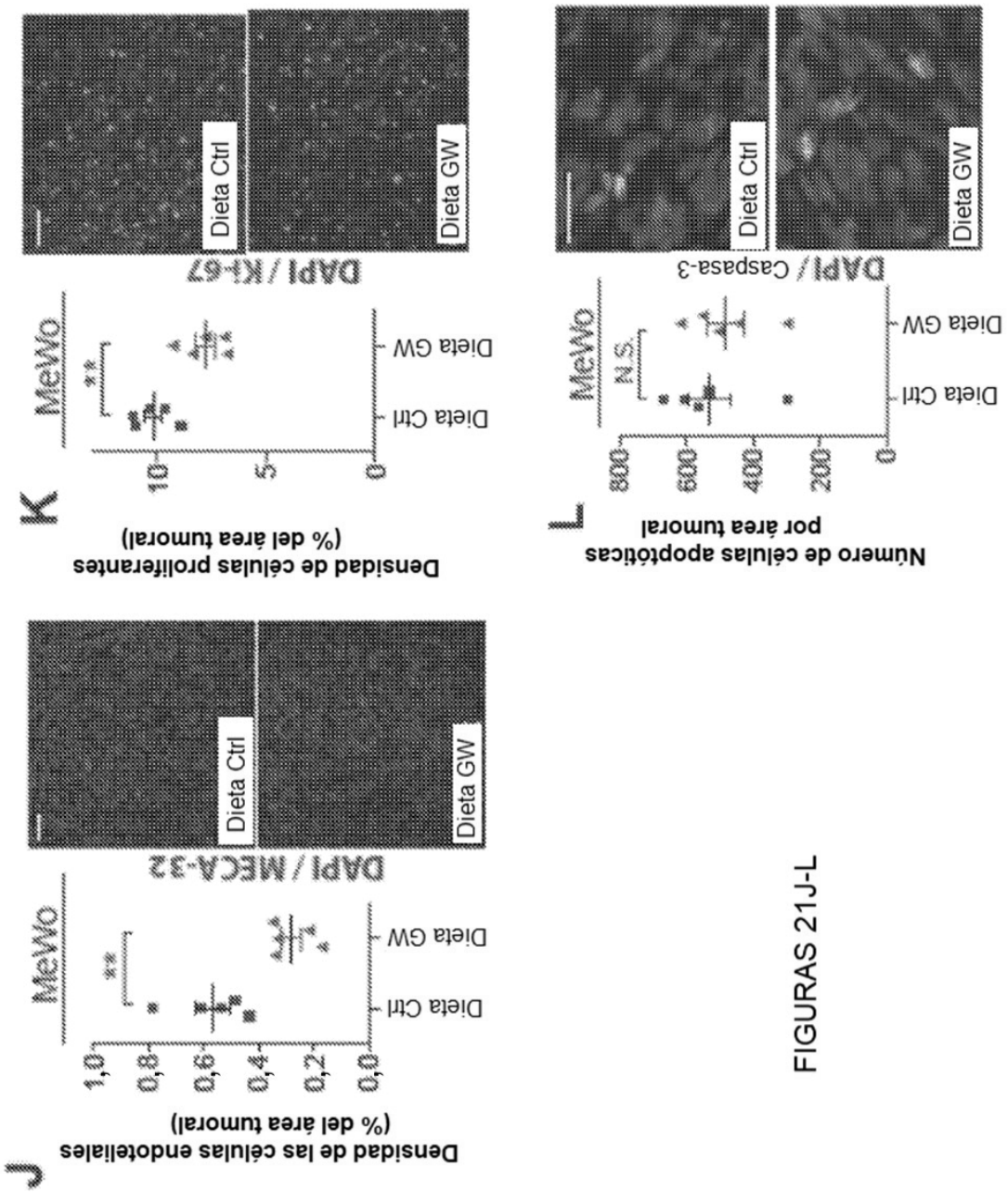
FIGURA 20A



FIGURAS 20B-G



FIGURAS 21A-I



FIGURAS 21J-L

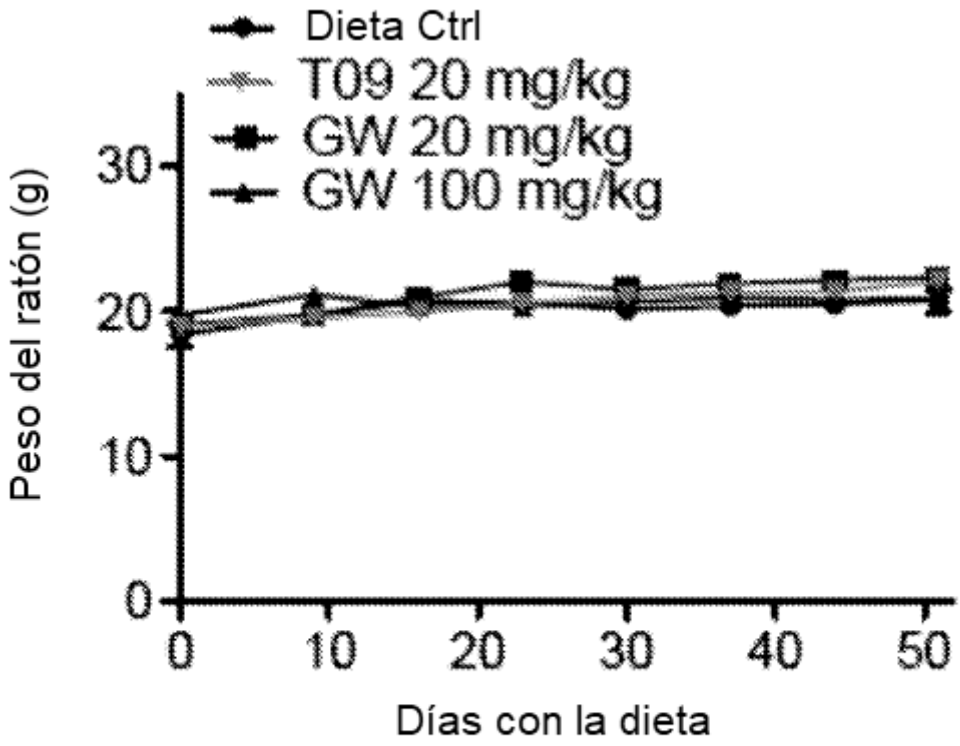
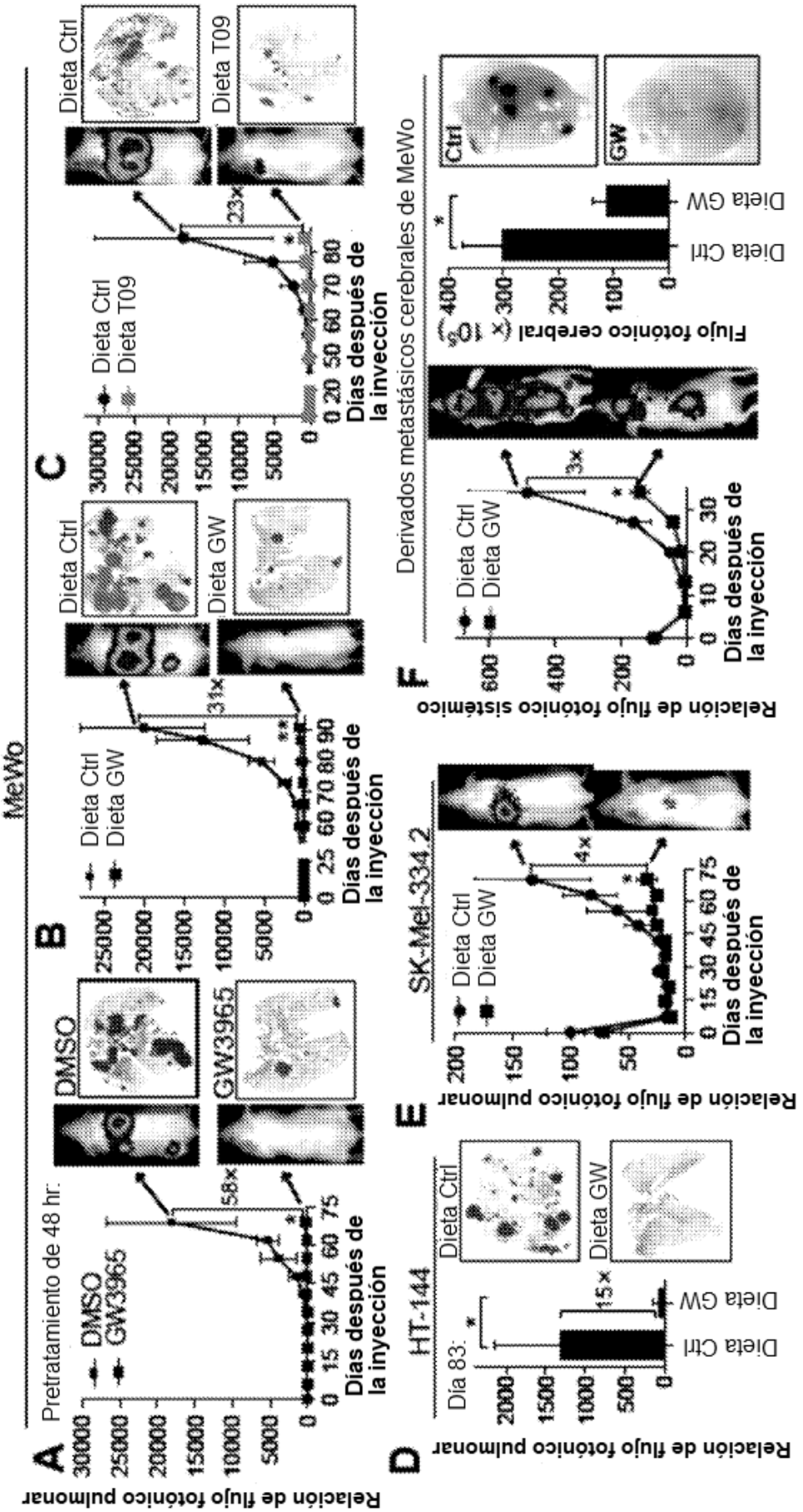
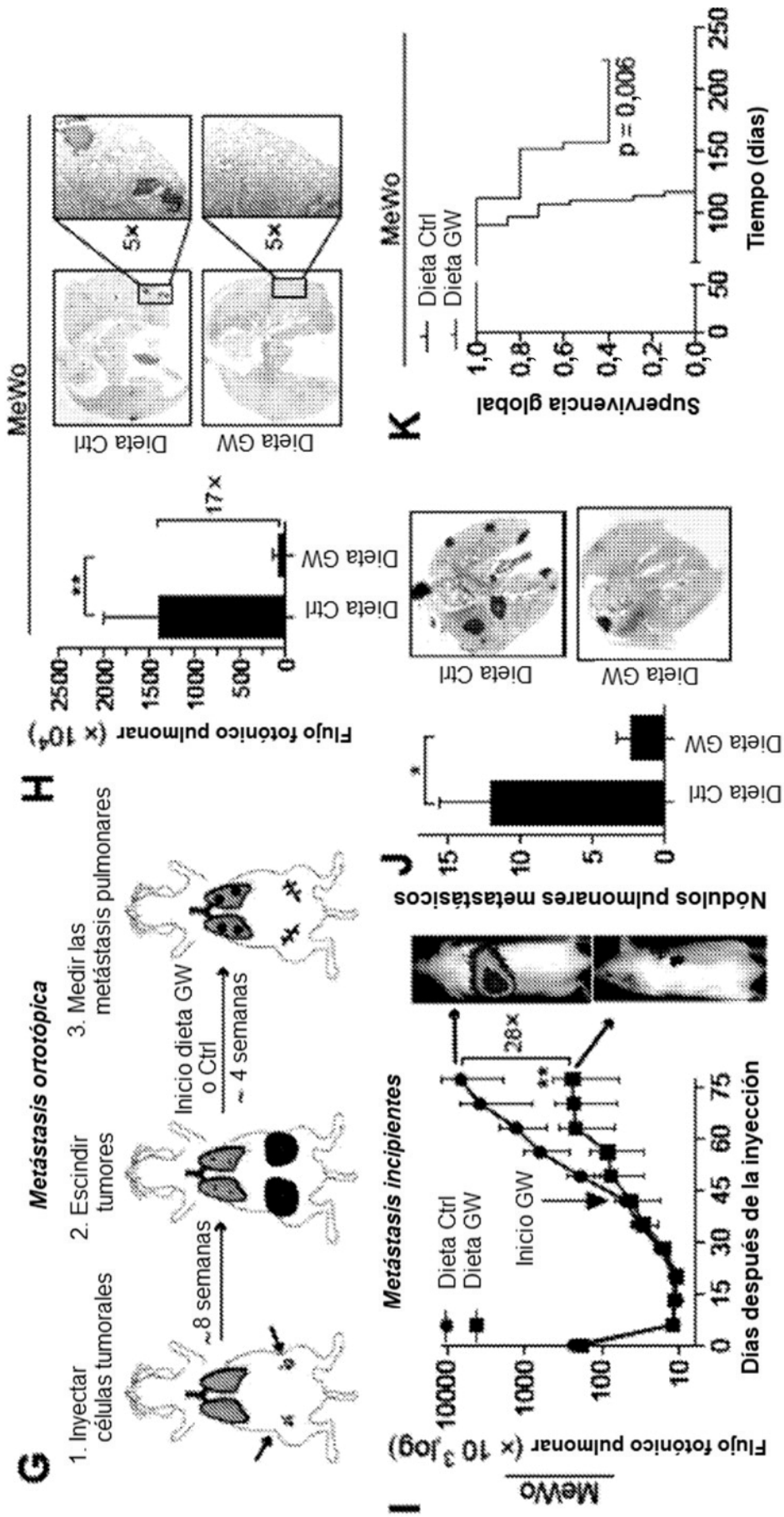

Dieta Ctrl
T09 20 mg/kg
GW 20 mg/kg
GW 100 mg/kg
Peso del ratón (g)
0
10
20
30
0
10
20
30
40
50
Días con la dieta

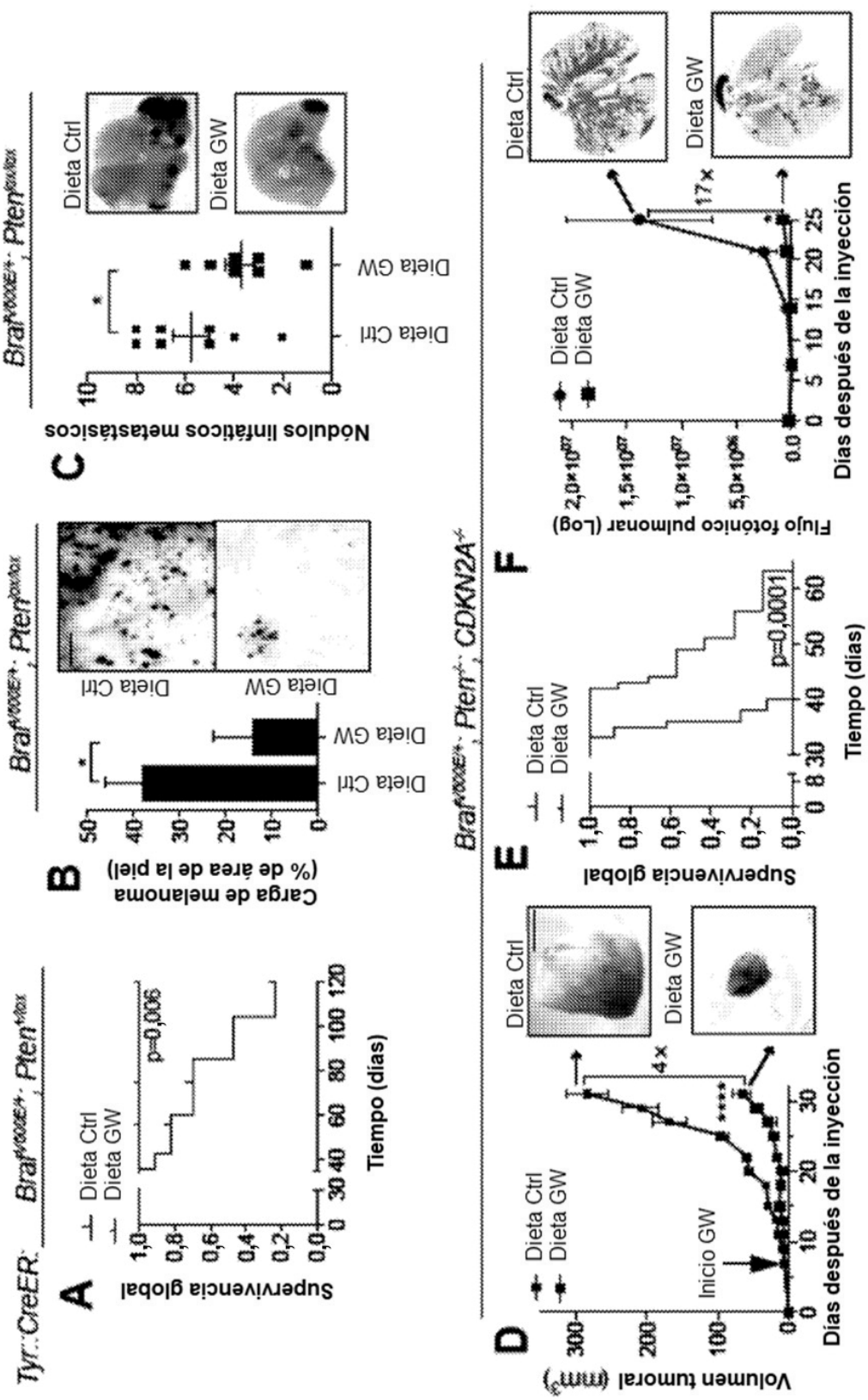
FIGURA 22



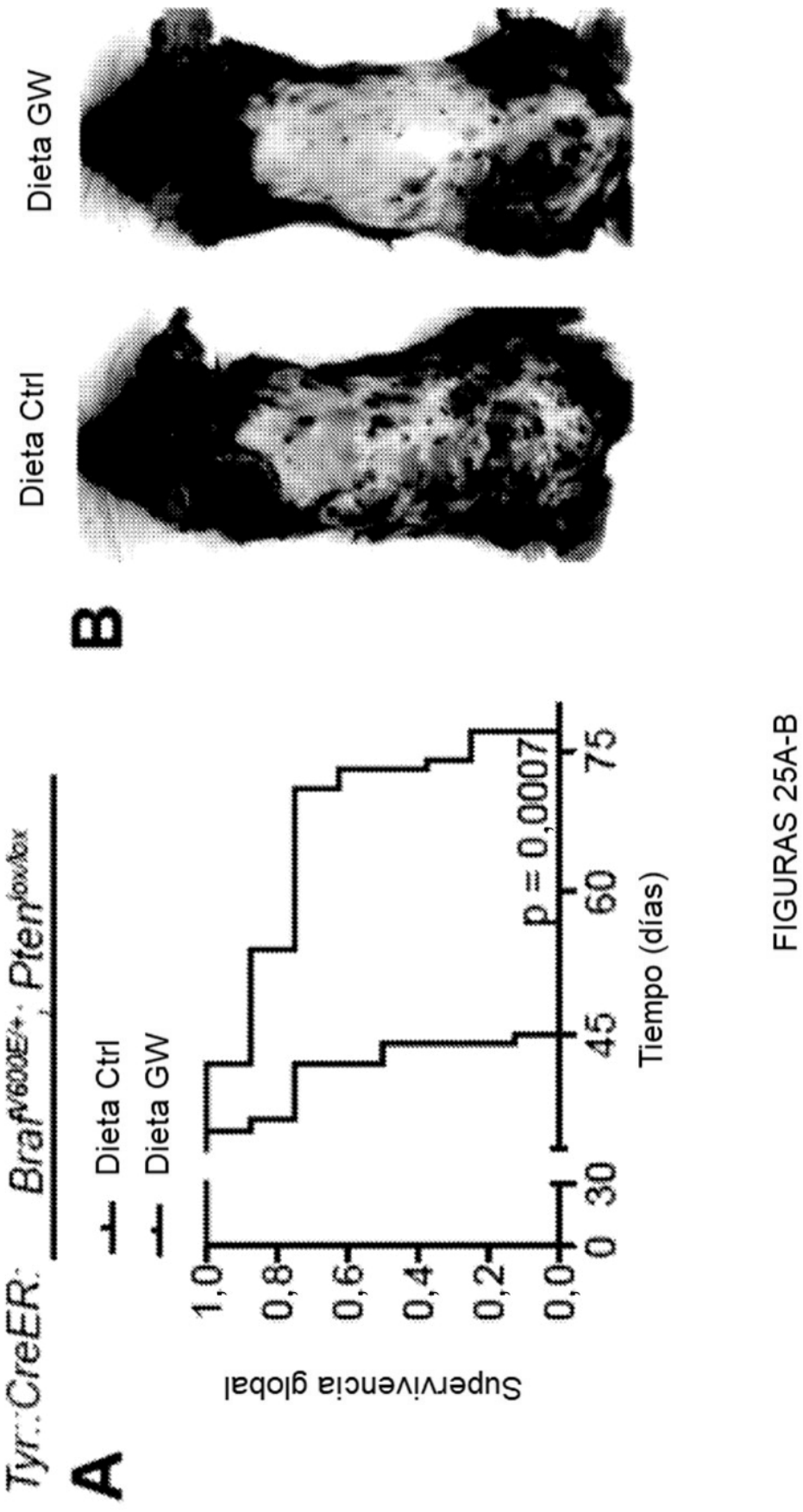
FIGURAS 23A-F



FIGURAS 23G-K



FIGURAS 24A-F



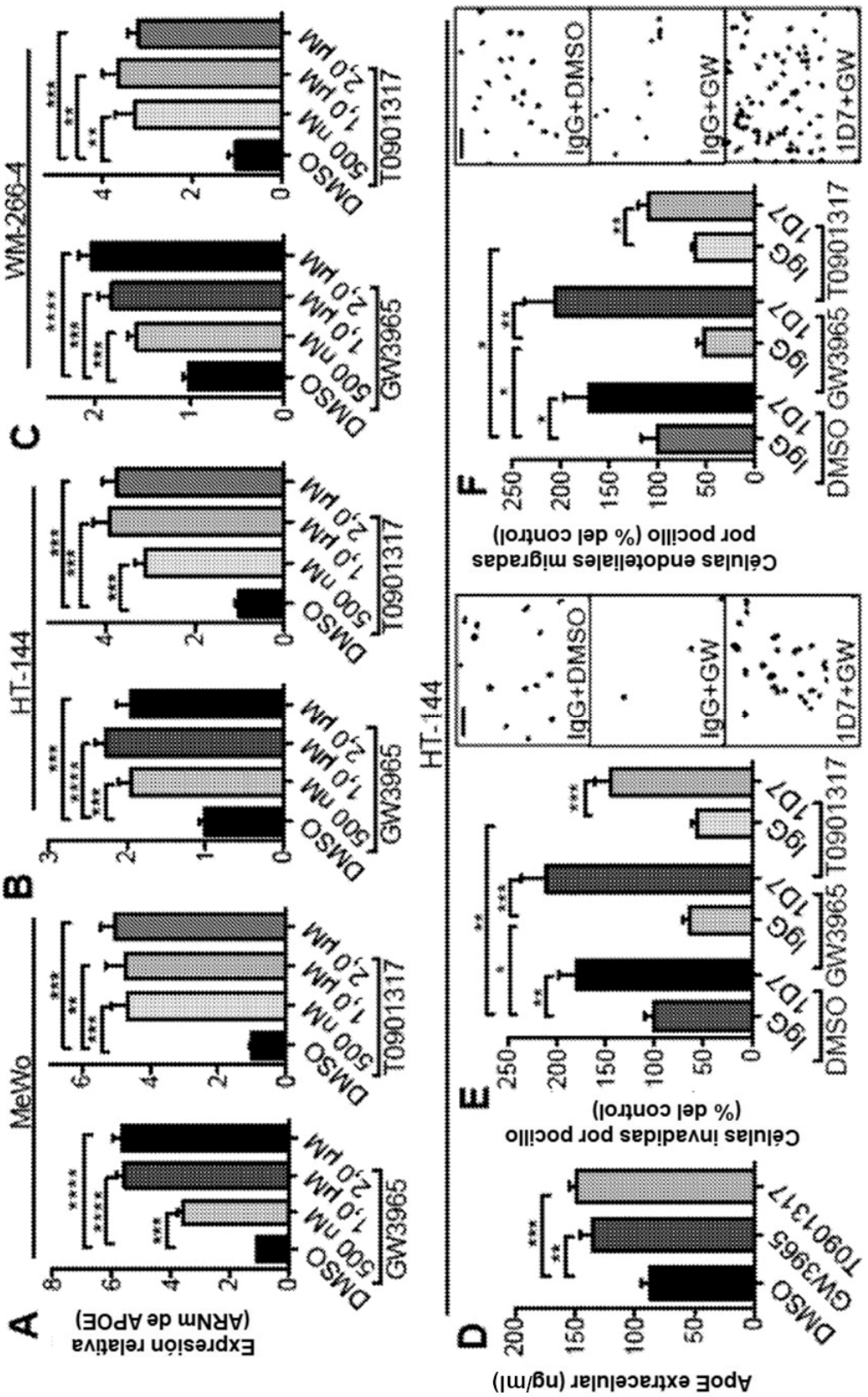
FIGURAS 25A-B

Tabla S1 Lista de los 50 genes más regulados al alza en células de melanoma humano MeWo en respuesta a tratamiento con GW3965

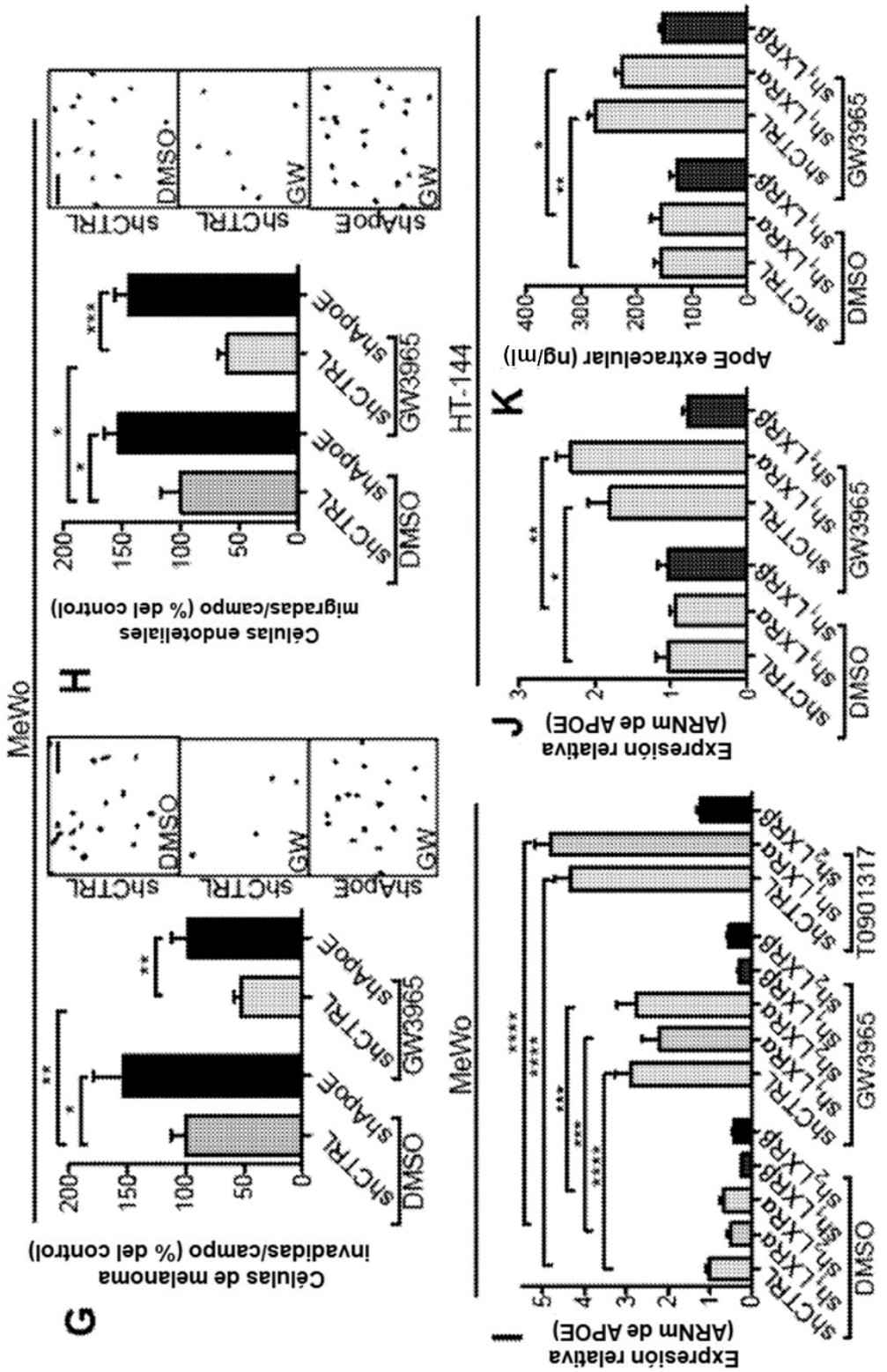
ID del Gen	Veces de cambio*	Valor q	Rango	ID del Gen	Veces de cambio*	Valor q	Rango
ABCA1	19,34	1,98E-11	1	*CEACAM1*	1,83	5,58E-06	26
SREBF1	8,08	9,12E-15	2	*LDLR*	1,79	1,29E-05	27
FABP7	7,43	1,85E-11	3	*IL1RAPL1*	1,78	1,58E-09	28
LOC645313	4,34	2,25E-10	4	*PPP1R3C*	1,78	1,64E-07	29
APOE	**4,11**	**1,04E-07**	5	*ABCD1*	1,76	4,24E-07	30
KRT34	4,09	5,99E-18	6	*C10ORF75*	1,67	2,91E-06	31
FASN	3,72	2,48E-07	7	*LSS*	1,66	1,86E-05	32
IGFBP5	2,91	1,15E-13	8	*DHCR7*	1,64	2,58E-06	33
TF	2,88	2,37E-12	9	*CAPS*	1,63	8,35E-06	34
INSIG1	2,62	3,15E-16	10	*PCYT2*	1,63	3,08E-06	35
MYLIP	2,56	9,21E-07	11	*C5ORF28*	1,62	3,71E-02	36
LPCAT3	2,54	2,80E-15	12	*TMEM119*	1,60	1,15E-04	37
ACACA	2,43	1,56E-12	13	*LPXN*	1,60	1,15E-07	38
SCD	2,42	3,56E-08	14	*SMPDL3A*	1,59	2,39E-04	39
FCRLA	2,19	9,13E-09	15	*SPOCD1*	1,58	7,18E-07	40
FADS1	2,12	2,01E-09	16	*ACLY*	1,58	6,56E-11	41
ACSS2	2,02	1,88E-08	17	*VGLL3*	1,57	1,32E-04	42
SLC2A6	2,02	5,99E-18	18	*MVD*	1,57	1,13E-03	43
ACSL3	1,94	5,35E-10	19	*NAV3*	1,55	2,32E-04	44
TMEM135	1,91	9,06E-07	20	*HS.538962*	1,55	1,40E-07	45
ADM	1,88	3,78E-05	21	*TUBB2B*	1,53	3,46E-08	46
LPIN1	1,88	5,94E-08	22	*LOC728285*	1,53	2,19E-06	47
MID1IP1	1,85	7,48E-09	23	*PHLDA2*	1,52	2,77E-07	48
FDPS	1,84	5,49E-05	24	*APOLD1*	1,51	9,50E-05	49
CCL2	1,83	1,00E-08	25	*BEX1*	1,51	1,08E-09	50

* Veces de regulación al alza en expresión génica basada en matriz para el tratamiento con GW3965 (1 µM, 48 hrs) frente al tratamiento control con DMSO

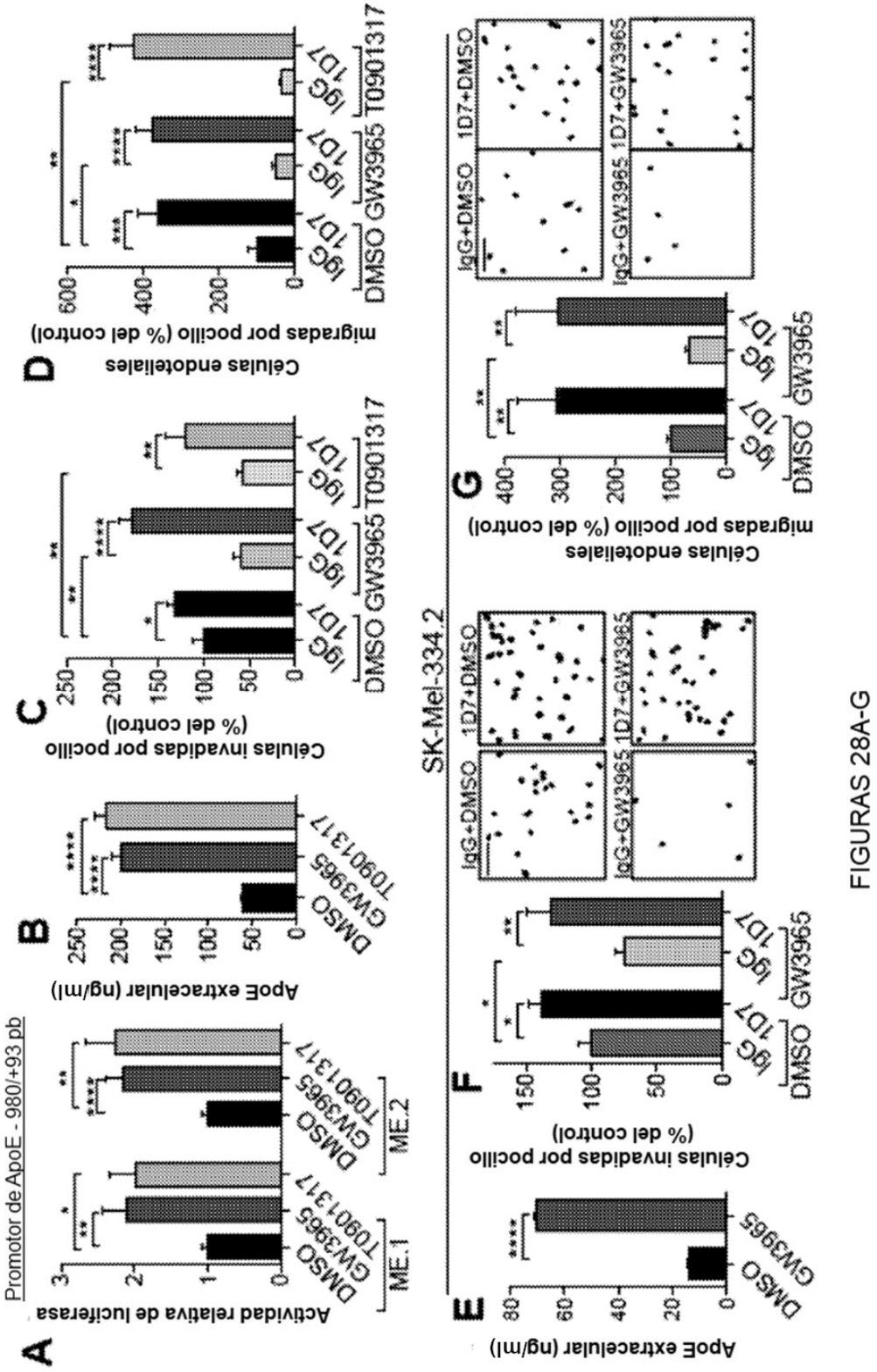
FIGURA 26



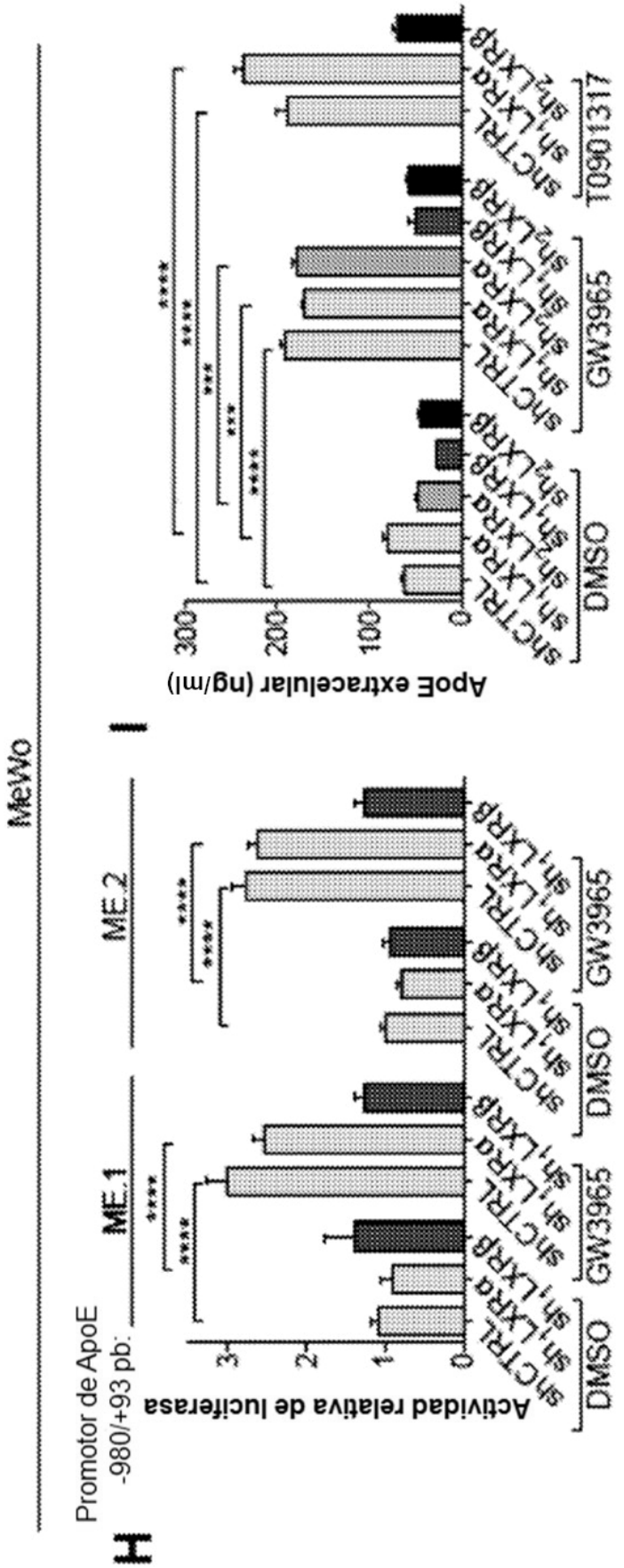
FIGURAS 27A-F



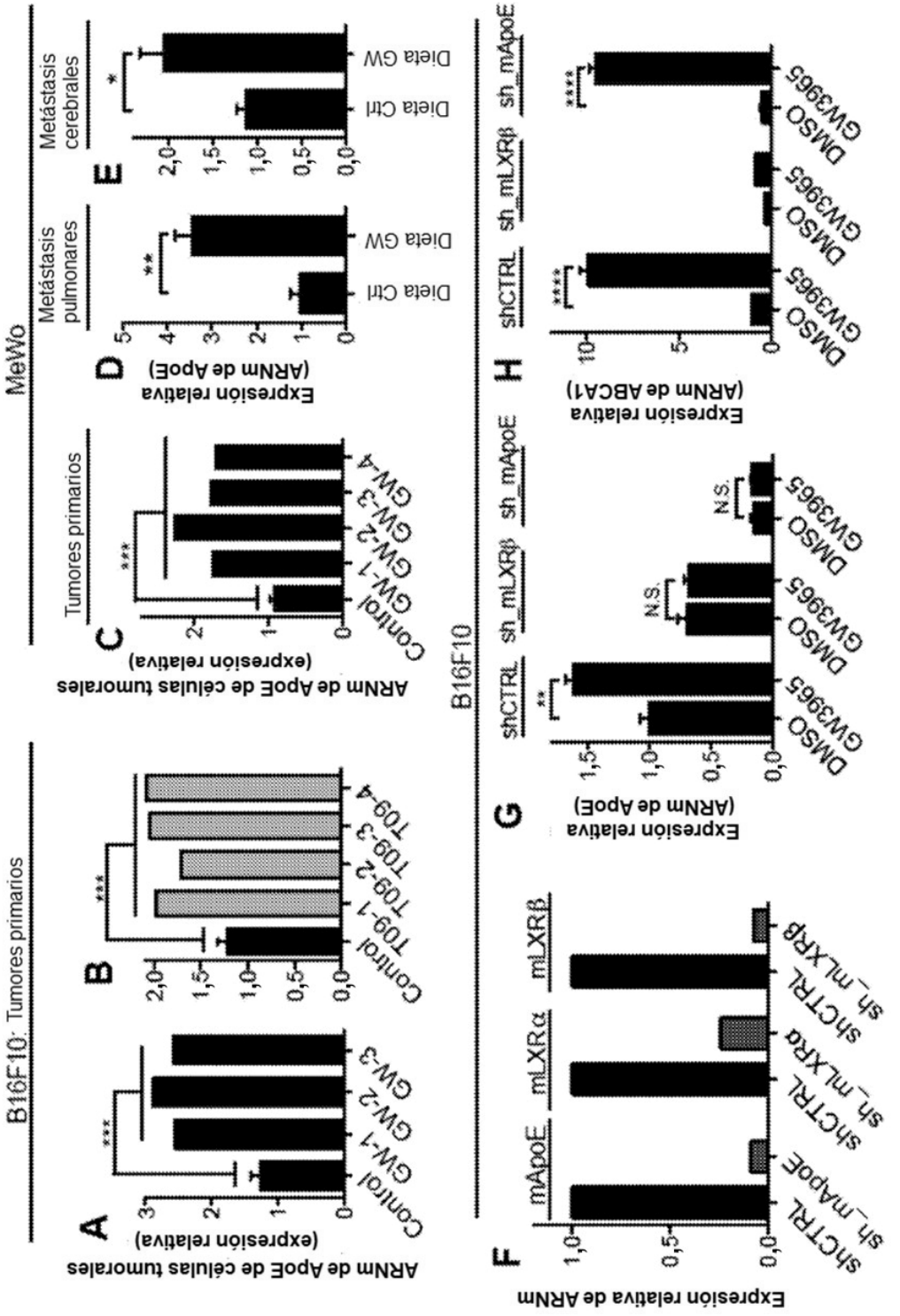
FIGURAS 27G-K



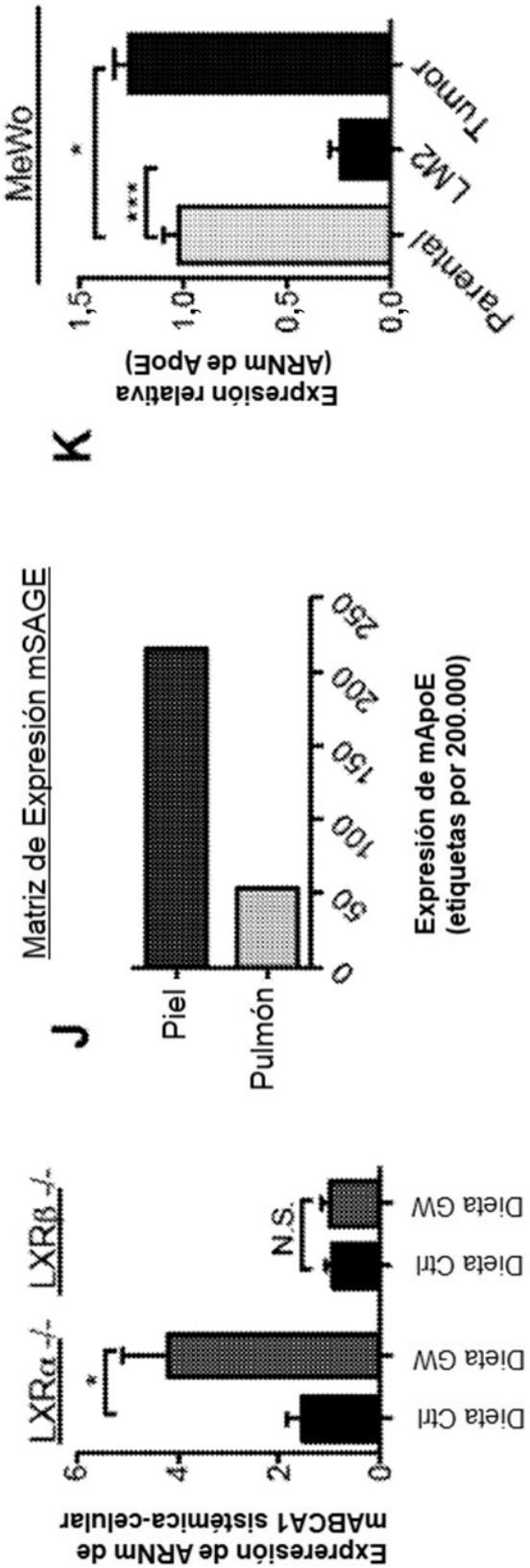
FIGURAS 28A-G



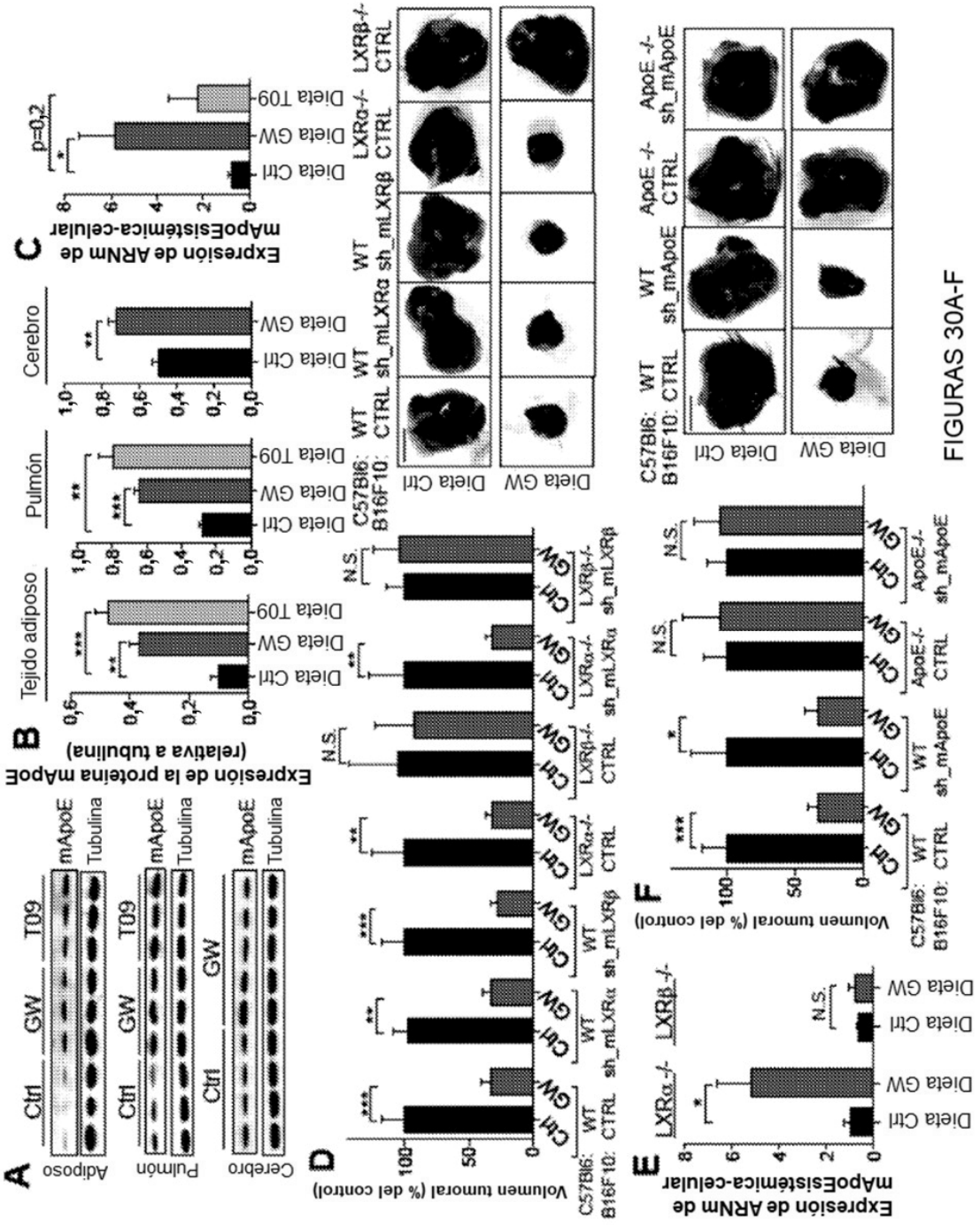
FIGURAS 28H-I



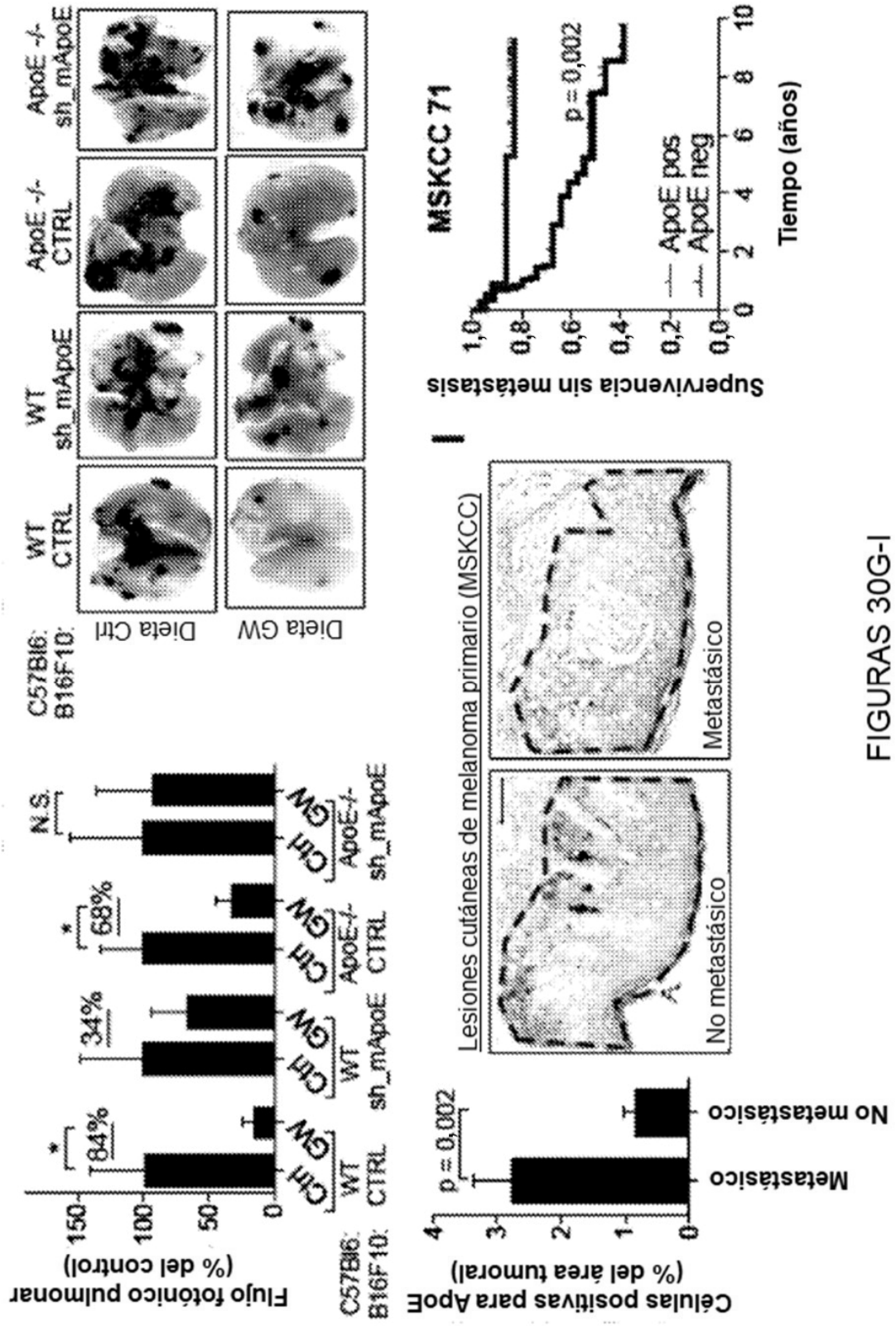
FIGURAS 29A-H



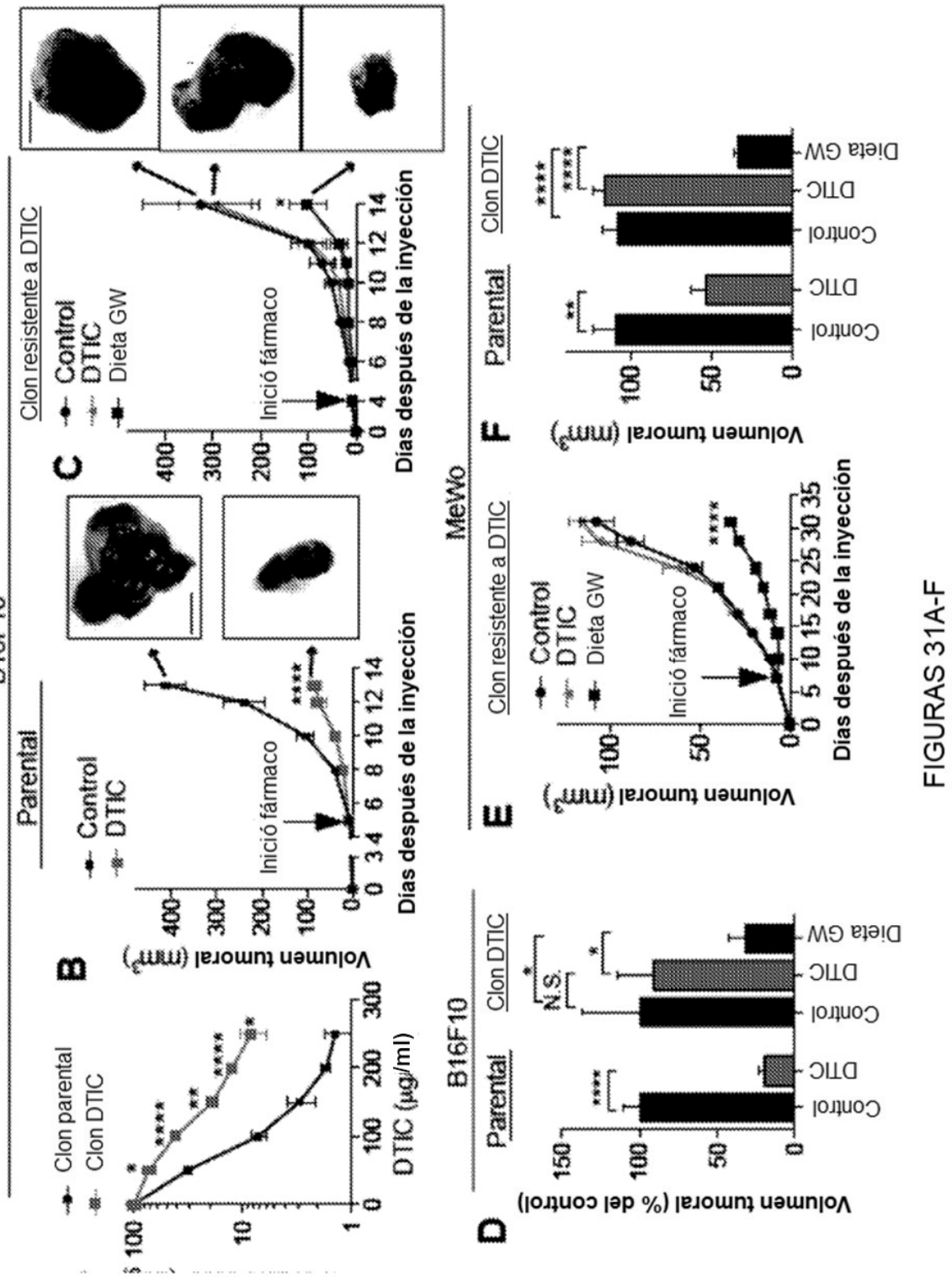
FIGURAS 29I-K



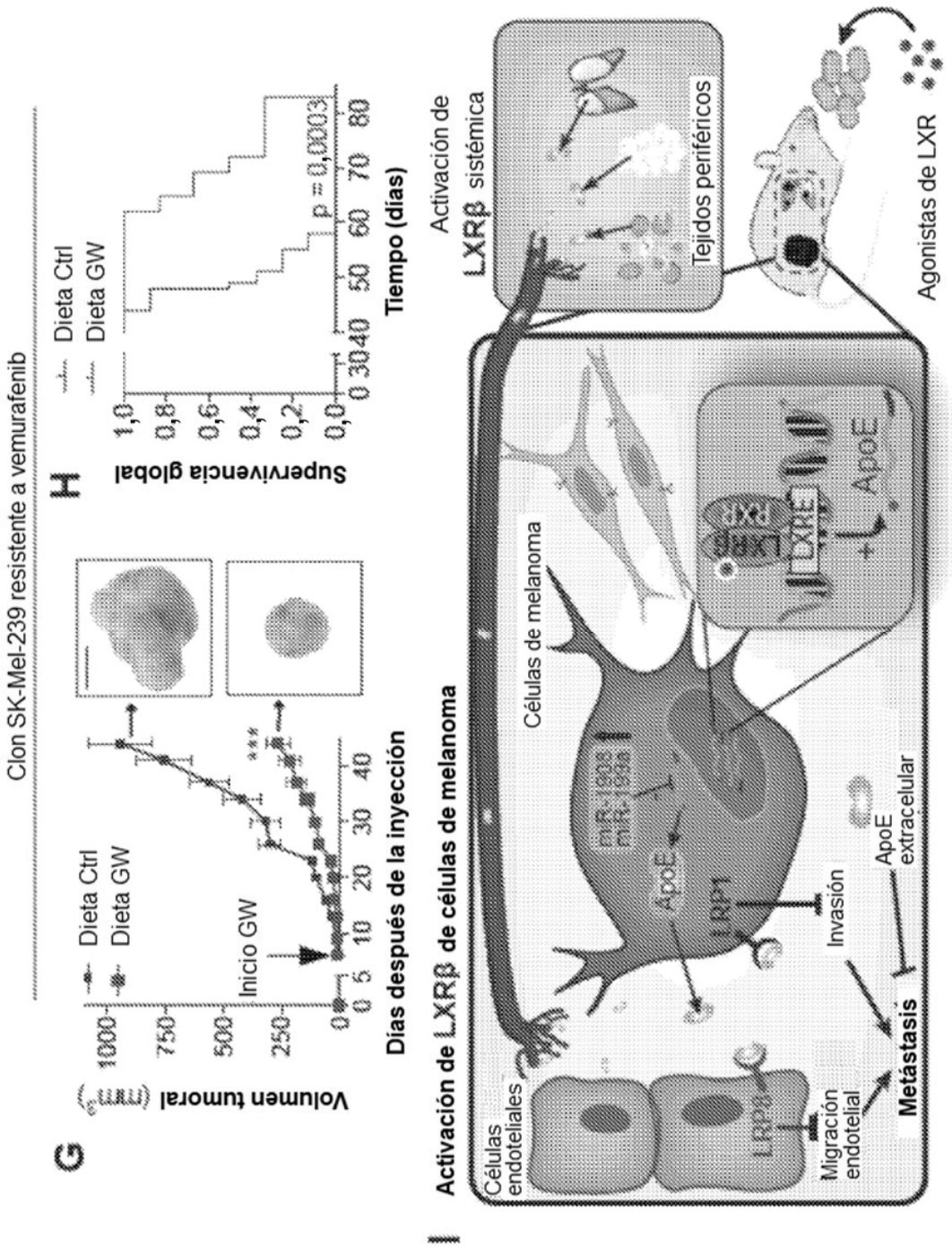
FIGURAS 30A-F



FIGURAS 30G-I



FIGURAS 31A-F



FIGURAS 31G-I

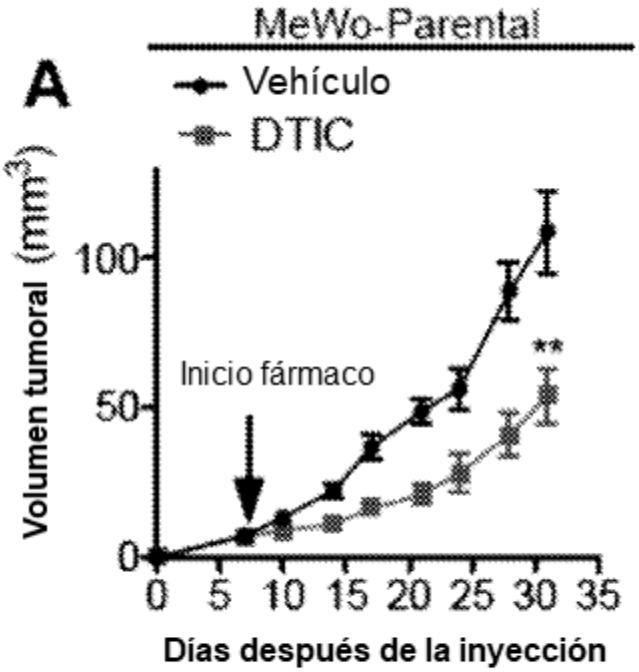
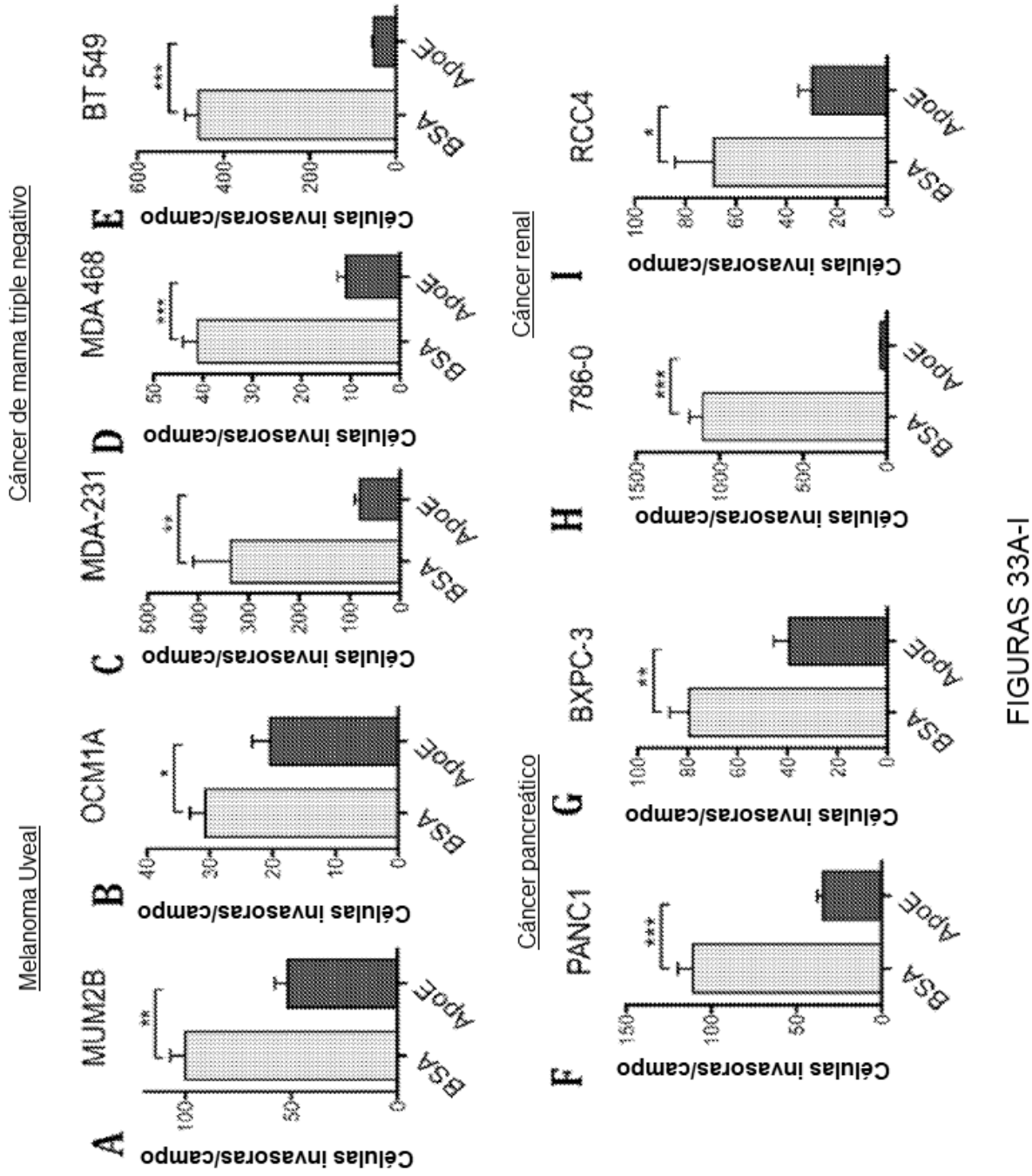
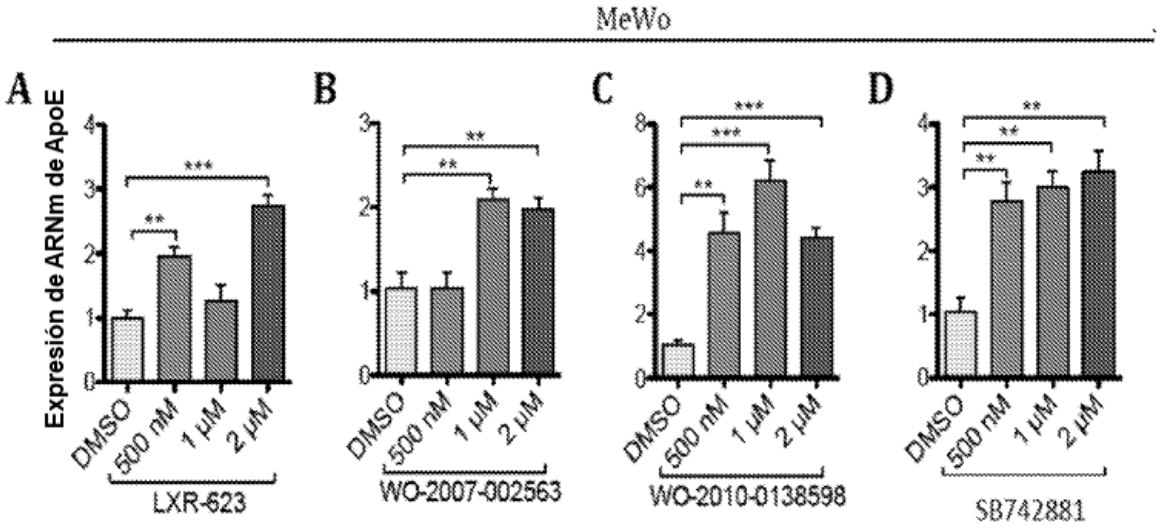

MeWo-Parental
A
Vehículo
DTIC
Volumen tumoral (mm3)
100
50
0
Inicio fármaco
**
0 5 10 15 20 25 30 35
Días después de la inyección

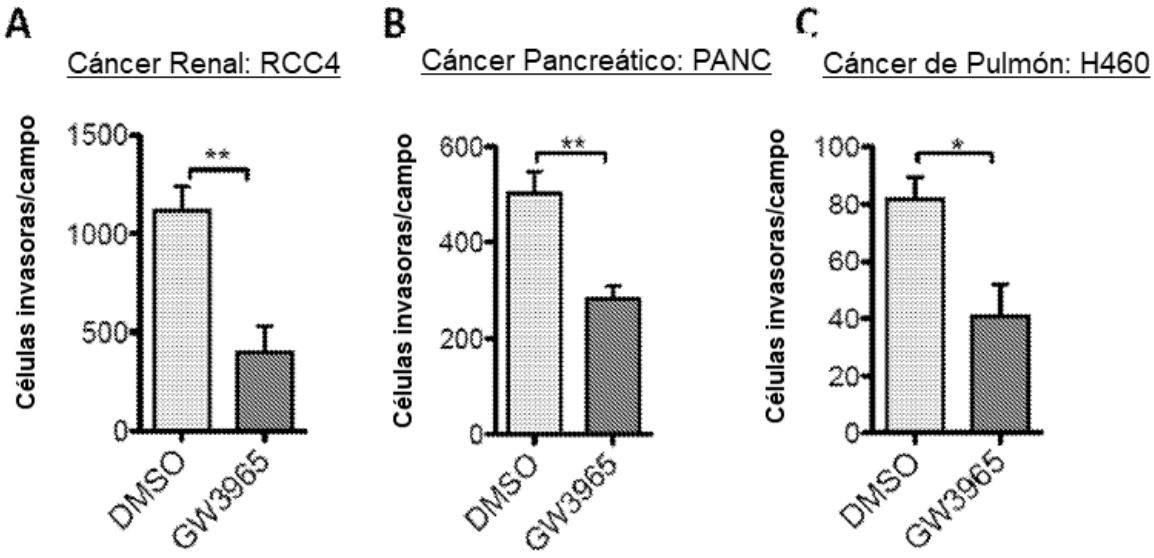
FIGURA 32



FIGURAS 33A-I



FIGURAS 34A-D



FIGURAS 35A-C

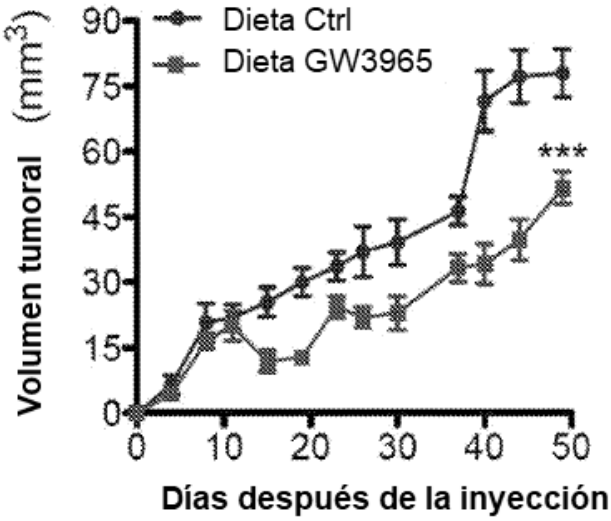
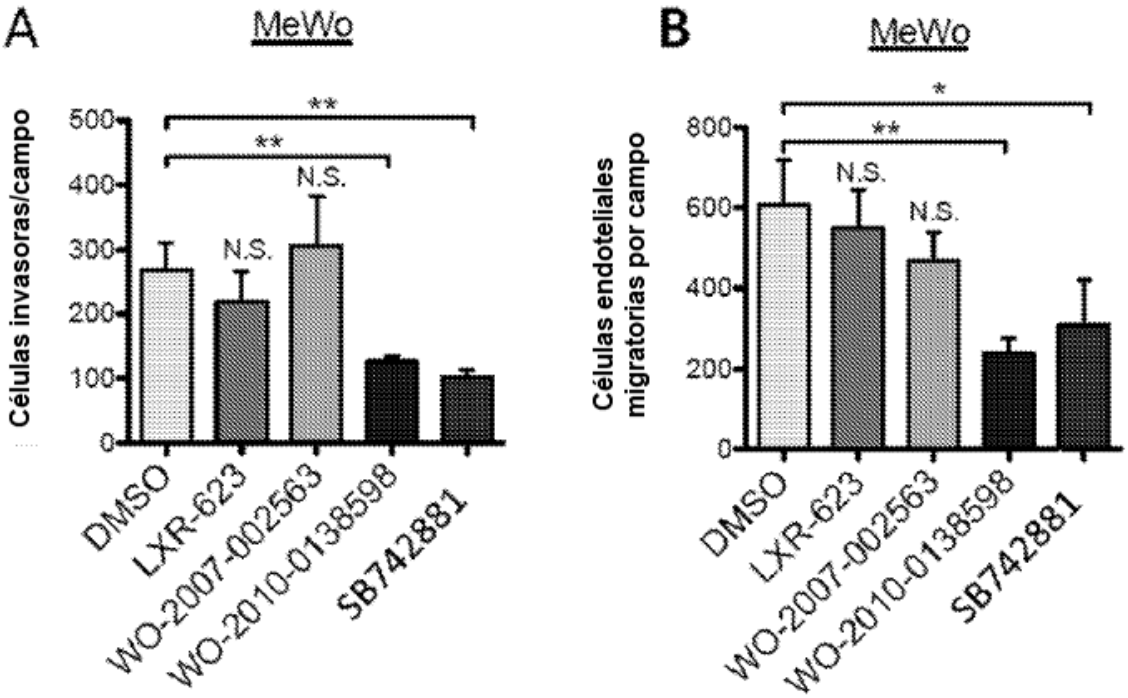
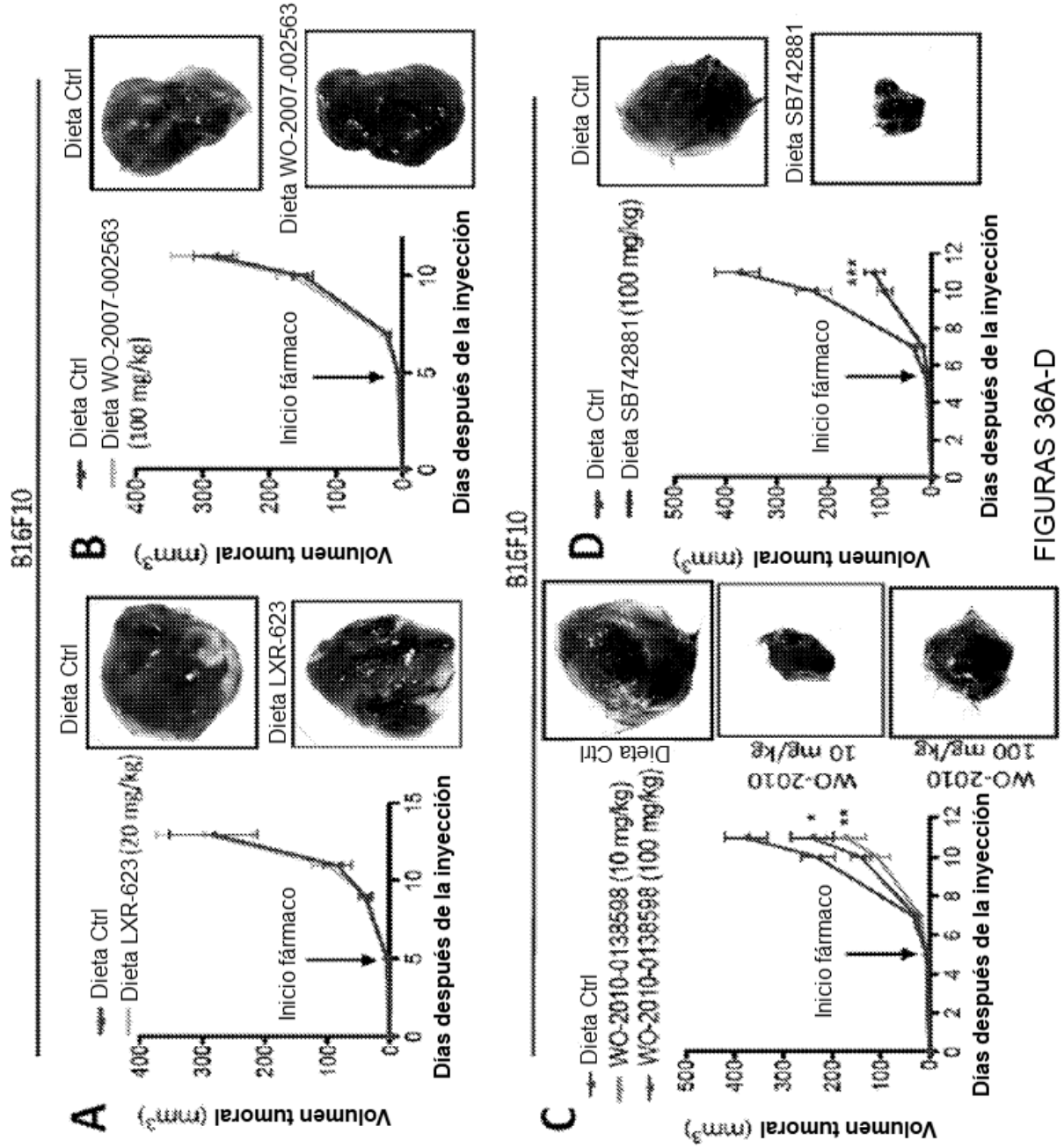


FIGURA 36



FIGURAS 37A-B



FIGURAS 36A-D