

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 573**

51 Int. Cl.:

**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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2013 PCT/US2013/054690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14028461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2013 E 13829165 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2882496**

54 Título: **Tratamiento y diagnóstico de melanoma**

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:

**09.06.2020**

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**

**ES 2 765 573 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Tratamiento y diagnóstico de melanoma

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de cánceres migratorios y melanoma.

**5 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).

WO 2010/138598 describe compuestos, sales, isómeros, o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son útiles como moduladores de la actividad de los receptores X hepáticos (LXR). También se describen composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos y métodos para usar los compuestos.

WO 2007/002563 describe compuestos y sales, isómeros, o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son útiles como moduladores de la actividad de los receptores X hepáticos. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos y métodos para usar los compuestos.

Pencheva et al. (2013) Nature Cell Biology, 15(6): 54-554, describe el control de la progresión metastásica por redes de reguladoras de microARN.

Zhang et al. (2014) Cancer Cell Int, 14:16, describe cómo la activación del receptor X hepático induce la apoptosis de células de melanoma a través de la ruta de la caspasa.

Pencheva et al. (2014) Cell, 156(5): 986-1001, describe la supresión terapéutica de amplio espectro de melanoma metastásico a través de la activación de los receptores de hormonas nucleares.

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.

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.

**Resumen de la invención**

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un agonista de LXR $\beta$ , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita según la reivindicación 1 de la presente memoria.

Esta descripción aborda la necesidad mencionada anteriormente proporcionando agentes y métodos para el diagnóstico y tratamiento del melanoma. La descripción se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de una red cooperativa de ARNmi-proteína desregulada en el melanoma metastásico. Esta red incluye varios factores supresores de metástasis y factores promotores de metástasis.

Esta descripción presenta un método para tratar cáncer, que incluye administrar a un sujeto que lo necesita, un agonista de LXR, en donde el agonista de LXR se administra en una cantidad suficiente como para incrementar el nivel de expresión o actividad de ApoE hasta un nivel suficiente como para ralentizar la diseminación de las metástasis del cáncer.

Esta descripción también presenta un método para tratar cáncer, que incluye administrar a un sujeto que lo necesita, un polipéptido ApoE en una cantidad suficiente como para tratar el cáncer.

En otro aspecto, esta descripción también presenta un método para ralentizar la diseminación de un cáncer migratorio, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, un agonista de LXR o un polipéptido ApoE.

- En determinadas realizaciones, el agonista de LXR incrementa el nivel de expresión de ApoE al menos 2,5 veces *in vitro*. En determinadas realizaciones, el agonista de LXR $\beta$  es selectivo para LXR $\beta$  sobre LXR $\alpha$ . En otras realizaciones, el agonista de LXR $\beta$  tiene actividad para LXR $\beta$  que es al menos 2,5 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR $\alpha$ . En algunas realizaciones, el agonista de LXR $\beta$  tiene actividad para LXR $\beta$  que es al menos 10 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR $\alpha$ . En realizaciones adicionales, el agonista de LXR $\beta$  tiene actividad para LXR $\beta$  que es al menos 100 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR $\alpha$ . En determinadas realizaciones, el agonista de LXR tiene actividad para LXR $\beta$  que está al menos en 2,5 veces la actividad de dicho agonista para LXR $\alpha$ .
- En algunas realizaciones, el cáncer migratorio es cáncer metastásico. El cáncer metastásico puede incluir células que presentan migración y/o invasión de células migratorias y/o incluir células que presentan reclutamiento endotelial y/o angiogénesis. En otras realizaciones, el cáncer migratorio es un cáncer con migración celular. En otras realizaciones adicionales, el cáncer con migración celular es un cáncer con migración celular no metastásico.
- El cáncer migratorio puede ser un cáncer que se disemina a través de la siembra de la superficie de los espacios peritoneal, pleural, pericárdico, o subaracnoideo. Alternativamente, el cáncer migratorio puede ser un cáncer que se disemina a través del sistema linfático, o un cáncer que se disemina hematogéneamente.
- En realizaciones particulares, el cáncer migratorio es un cáncer con migración celular que es un cáncer con migración celular no metastásico, tal como cáncer de ovario, mesotelioma, o cáncer de pulmón primario.
- Esta descripción también proporciona un método para inhibir o reducir las metástasis del cáncer que comprende administrar un agonista de LXR o un polipéptido ApoE.
- Esta descripción también proporciona un método para inhibir la proliferación o crecimiento de células madre del cáncer o células iniciadoras del cáncer, que incluye poner en contacto la célula con un agonista de LXR o un polipéptido ApoE en una cantidad suficiente como para inhibir la proliferación o crecimiento de dicha célula.
- Esta descripción también proporciona un método para reducir la tasa de siembra tumoral de un cáncer que incluye administrar a un sujeto que lo necesita un agonista de LXR o un polipéptido ApoE en una cantidad suficiente como para reducir la siembra tumoral.
- Esta descripción también proporciona un método para reducir o tratar la formación de nódulos metastásicos del cáncer que incluye administrar a un sujeto que lo necesita un agonista de LXR o un polipéptido ApoE en una cantidad suficiente como para tratar dicha formación de nódulos metastásicos del cáncer.
- En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de células renales, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de próstata, sarcoma, o melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de células renales. En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer pancreático. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de colon. En realizaciones adicionales, el cáncer es cáncer de ovario.
- En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer resistente a fármacos. En realizaciones adicionales, el cáncer es resistente a vemurafenib, dacarbazina, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD1, o un inhibidor de PDL1.
- En algunas realizaciones, el método comprende administrar un agonista de LXR seleccionado de la lista que consiste en un compuesto de una cualquiera de las Fórmulas I-IV o cualquiera de los números de compuesto 1-39, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, el agonista de LXR es el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, el agonista de LXR es el compuesto 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En determinadas realizaciones, el agonista de LXR es el compuesto 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones adicionales, el agonista de LXR es el compuesto 12 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el agonista de LXR es el compuesto 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, el agonista de LXR es el compuesto 38 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones adicionales, el agonista de LXR es el compuesto 39 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- El método puede incluir además administrar 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.
- En algunas realizaciones, el método comprende administrar un polipéptido ApoE. El fragmento del polipéptido ApoE puede incrementar el nivel de actividad o el nivel de expresión de LRP1 o LRP8, y/o el polipéptido ApoE puede unirse a LRP1 o LRP8, el polipéptido ApoE puede ser la región de unión al receptor (RBR) de ApoE. El método puede incluir además administrar un antiproliferativo, en donde dicho polipéptido ApoE 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 polipéptido ApoE 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.

5 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 del grupo de compuestos tales como agentes quimioterapéuticos y citotóxicos, agentes inductores de la diferenciación (p. ej., ácido retinoico, vitamina D, citoquinas), agentes hormonales, agentes inmunológicos y agentes anti-angiogénicos. Los agentes quimioterapéuticos y citotóxicos incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes, antibióticos  
10 citotóxicos, antimetabolitos, alcaloides de vinca, etopósidos, y otros (p. ej., paclitaxel, taxol, docetaxel, taxotere, cisplatino). Una lista de compuestos adicionales que tienen actividad antiproliferativa puede encontrarse en L. Brunton, B. Chabner y B. Knollman (eds). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Duodécima Edición, 2011, McGraw Hill Companies, Nueva York, NY.

15 El método puede incluir además administrar un compuesto antiproliferativo seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, agentes de platino, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasa, antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, inhibidores de aromatasas, inhibidores de la timidilato sintasa, antagonistas de ADN, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de bombas, inhibidores de histona acetiltransferasa, inhibidores de metaloproteinasas, 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  
20 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-CS1, inhibidores de FGFR3, inhibidores de VEGF, inhibidores de MEK, inhibidores de ciclina D1, inhibidores de NF-kB, antraciclina, 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  
25 proliferativas. Los ejemplos de dichos compuestos se proporcionan en las Tablas 1.

Esta descripción también presenta un método para tratar melanoma (p. ej., melanoma metastásico) en un sujeto que lo necesita. El método incluye (a) incrementar en el sujeto el nivel de expresión o el nivel de actividad de un factor supresor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en DNAJA4, Apolipoproteína E (ApoE), LRP1, LRP8, Receptor X Hepático (LXR, p. ej., tanto LXR-alfa como LXR-beta), y miR-7 o (b) disminuir en el sujeto el nivel de  
30 expresión o el nivel de actividad de un factor promotor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF.

En el método, la etapa de incremento puede llevarse a cabo mediante la administración al sujeto de uno o más de los siguientes: (i) un polipéptido que tiene una secuencia de DNAJA4, ApoE o un fragmento de ApoE, LRP1, LRP8, o LXR; (ii) un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, o LXR; (iii) un ligando para LRP1, LRP8, o LXR; y (iv) un agente ARNi que codifica miR-7. Los ejemplos del ligando de LRP1 o LRP8 incluyen la parte de unión al receptor de ApoE, anticuerpos anti-LRP1 o anti-LRP8, y ligandos que son moléculas pequeñas. En un ejemplo, el incremento del nivel de expresión de ApoE puede llevarse a cabo mediante el incremento del nivel de actividad o el nivel de expresión de LXR. El incremento del nivel de expresión de DNAJA4 también puede llevarse a cabo mediante el incremento del nivel de actividad o el nivel de expresión de LXR. El nivel de actividad de LXR puede incrementarse mediante la administración al sujeto de un ligando de LXR, tales como los compuestos de Fórmula I-IV como se describe más adelante. La etapa de incremento también puede llevarse a cabo mediante la disminución del nivel de expresión o el nivel de actividad de un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908. Para este fin, se pueden usar varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la tecnología miR-Zip, Ácido Nucleico Bloqueado (LNA), y tecnología antagomir como se describe en los ejemplos más adelante.  
45

Esta descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, melanoma metastásico. El método incluye obtener del sujeto una muestra; medir en la muestra (i) un primer nivel de expresión de un factor promotor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF, o (ii) un segundo nivel de expresión de un factor supresor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, LXR, y miR-7; y comparar el primer nivel de expresión con un primer valor de referencia predeterminado, o el segundo nivel de expresión con un segundo valor de referencia predeterminado. Se determina que el sujeto tiene, o que está en riesgo de tener, melanoma metastásico si (a) el primer nivel de expresión está por encima de un primer valor de referencia predeterminado o (b) el segundo nivel de expresión está por debajo de un segundo valor de referencia predeterminado. El primer y segundo valores de referencia predeterminados pueden obtenerse a partir de un sujeto control que no tiene melanoma metastásico. En una realización, la etapa de medición incluye medir tanto el primer nivel de expresión como el segundo nivel de expresión. La muestra puede ser una muestra de fluido corporal, una muestra de tumor, una muestra de nevo, o una muestra de piel humana.  
50

Esta descripción también proporciona una matriz que tiene un soporte que tiene una pluralidad de localizaciones únicas, y cualquier combinación de (i) al menos un ácido nucleico que tiene una secuencia que es complementaria a un ácido nucleico que codifica un factor promotor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p,  
60

miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF o un complemento del mismo, o (ii) al menos un ácido nucleico que tiene una secuencia que es complementaria a un ácido nucleico que codifica un factor supresor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, LXR, y miR-7 o un complemento del mismo. Preferiblemente, cada ácido nucleico se inmoviliza en una localización única del soporte. Esta matriz puede usarse para el diagnóstico y pronóstico del melanoma metastásico.

De acuerdo con esto, la descripción también proporciona un kit para el diagnóstico de un potencial metastásico de melanoma en un sujeto. El kit incluye un primer reactivo que se une específicamente a un producto de expresión de un gen supresor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, LXR, y miR-7; o un segundo reactivo que se une específicamente a un producto de expresión de un gen promotor de metástasis seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF. El segundo agente puede ser una sonda que tiene una secuencia complementaria al gen supresor o promotor o un complemento del mismo. El kit puede contener además reactivos para realizar un inmunoensayo, ensayo de hibridación, o un ensayo de PCR. En una realización, el kit contenía la matriz mencionada anteriormente.

Esta descripción también proporciona un método para identificar un compuesto útil para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión celular, o angiogénesis metastásica. El método incluye (i) obtener una célula de ensayo que expresa un gen informador codificado por un ácido nucleico unido de forma operativa a un promotor de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, y CTGF; (ii) exponer la célula de ensayo a un compuesto de ensayo; (iii) medir el nivel de expresión del gen informador en la célula de ensayo; (iv) comparar el nivel de expresión con un nivel control; y (v) seleccionar el compuesto de ensayo como un candidato útil para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica, si la comparación indica que el nivel de expresión es menor que el nivel control.

La descripción proporciona otro método para identificar un compuesto útil para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión celular, o angiogénesis metastásica. El método incluye (i) obtener una célula de ensayo que expresa un gen informador codificado por un ácido nucleico unido de forma operativa a un promotor de un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, LXR, y miR-7; (ii) exponer la célula de ensayo a un compuesto de ensayo; (iii) medir el nivel de expresión del gen informador en la célula de ensayo; (iv) comparar el nivel de expresión con un nivel control; y (v) seleccionar el compuesto de ensayo como un candidato útil para tratar melanoma o para inhibir el reclutamiento endotelial, invasión de células cancerosas, o angiogénesis metastásica, si la comparación indica que el nivel de expresión es mayor que el nivel control.

En los métodos de identificación mencionados anteriormente, el gen informador puede ser un gen informador estándar (tal como gen de LaxZ, GFP, o luciferasa, o semejantes), conocido en la técnica, o uno de los genes supresores de metástasis o genes promotores de metástasis mencionados anteriormente. En los métodos, el nivel control puede obtenerse a partir de una célula control que es la misma que la célula de ensayo excepto porque la célula control no se ha expuesto al compuesto de ensayo.

Esta descripción también proporciona un método para inhibir el reclutamiento endotelial, inhibir la invasión de células tumorales, o tratar cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita, mediante la administración al sujeto de un agente que inhibe la expresión o actividad de CTGF. El sujeto puede ser uno que tiene un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica, incluyendo, pero no limitado a, cáncer (p. ej., melanoma metastásico), un trastorno ocular, y un trastorno inflamatorio. Un ejemplo de la célula tumoral es una célula de melanoma metastásico. Los ejemplos del agente incluyen un anticuerpo, un ácido nucleico, un polipéptido, y un compuesto que es una molécula pequeña. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Esta descripción también proporciona un método para inhibir el reclutamiento endotelial, inhibir la invasión de células tumorales, o tratar cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita, mediante la administración al sujeto de un agente que incrementa la expresión o actividad de miR-7. Un ejemplo de la célula tumoral es una célula de melanoma metastásico. Los ejemplos del agente incluyen un anticuerpo, un ácido nucleico, un polipéptido, y un compuesto que es una molécula pequeña. En un ejemplo, el agente tiene actividad miR-7. El ácido nucleico puede ser un oligonucleótido. Y, el oligonucleótido puede incluir una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID No. 36-38.

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 hematogena 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, "ralentizar la diseminación de cáncer migratorio" se refiere a reducir o parar la formación de nuevos loci; o reducir, parar, o revertir la carga tumoral.

- 5 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 hematológica, 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, "ralentizar la diseminación de metástasis" se refiere a reducir o parar la formación de nuevos loci; o reducir, parar, revertir la carga tumoral.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 "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.
- 25 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 hematológica.
- 30 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.
- 35 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 descripción presenta además métodos para tratar un trastorno de adhesión celular mediante la administración de un agonista de LXR o polipéptido ApoE.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 Los detalles de una o más realizaciones de la descripción se muestran en la descripción más adelante. Otras características, objetos, y ventajas de la descripción 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 imaginería bioluminiscente de la colonización metastásica de pulmón después de la inyección intravenosa de  $4 \times 10^4$  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 imaginería bioluminiscente y pulmones teñidos con H y E correspondientes a metástasis pulmonares después de la inyección intravenosa de  $4 \times 10^4$  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 (CTRLsh). 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  $2 \times 10^5$  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 imaginería 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  $\pm$  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 subcutáneamente  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  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  $5 \times 10^4$  células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en el fondo de un pocillo, y se dejó que  $1 \times 10^5$  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  $5 \times 10^4$  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  $2 \times 10^5$  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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m. 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 calor 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  $1 \times 10^5$  células MeWo-LM2 que expresan un vector control o que sobreexpresan ApoE o DNAJA4. n=4. (G) Capacidad de reclutamiento endotelial por  $5 \times 10^4$  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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m. 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 imagería bioluminiscente y tinción con H y E de pulmones representativos de metástasis pulmonar después de la inyección intravenosa de  $1 \times 10^5$  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 (CTRLsh); n=97 (APOEsh<sup>1</sup>); n=38 (APOEsh<sup>2</sup>); n=200 (DNAJA4sh<sup>1</sup>); n=19 (DNAJA4sh<sup>2</sup>). Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m. 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 delección 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  $\mu$ g/mL) o IgG (40  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo IgG control (40  $\mu$ g/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  $\mu$ M) o ApoE3 recombinante (100  $\mu$ M) 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  $\mu$ g/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  $\mu$ M) o ApoE3 recombinante (100  $\mu$ M). 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  $\mu$ g/mL. Después de 24 horas, se inyectaron intravenosamente  $4 \times 10^4$  células en ratones NOD-SCID, y se monitorizó la colonización pulmonar por imagería bioluminiscente. n=6. (M) Metástasis pulmonares por  $5 \times 10^4$  células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas intravenosamente 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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m.

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  $1 \times 10^5$  células LM2 transducidas con ARNsi dirigidos a LDLR, VLDLR, LRP8, LRP1, o una secuencia control en presencia bien de BSA (100  $\mu$ M) o ApoE3 recombinante (100  $\mu$ M). n=4-7. (B) Se transfectaron  $1 \times 10^5$  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) Imagería bioluminiscente de colonización pulmonar por  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  células endoteliales preincubadas con BSA (100  $\mu$ M) o ApoE3 recombinante (100  $\mu$ M) durante 24 horas para determinar el fenotipo de reclutamiento endotelial por  $5 \times 10^5$  células LM2. n=3-4. (E) Se transdujeron  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  células endoteliales en presencia de anticuerpos IgG (40  $\mu$ g/mL) o 1D7 (40  $\mu$ g/mL) añadidos al medio celular. n=6-8. (G) Migración trans-well por  $1 \times 10^5$  células endoteliales transducidas con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control en presencia de BSA (100  $\mu$ M) o ApoE3 recombinante (100  $\mu$ M). n=6-7. (H) Se transdujeron  $1 \times 10^5$  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 subcutáneamente por encima del flanco ventral de ratones, que contenían BSA (10  $\mu$ g/mL), VEGF (400 ng/mL) + BSA (10  $\mu$ g/mL), o VEGF (400 ng/mL) + ApoE3 recombinante (10  $\mu$ g/mL). n=3-6. (J) Densidad de los vasos sanguíneos en nódulos metastásicos pulmonares formados después de la inyección intravenosa de  $5 \times 10^4$  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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m.

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 intravenosamente  $1 \times 10^5$  células en ratones inmunodeficientes. n=5-6. (F) Metástasis sistémicas por  $1 \times 10^5$  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  $4 \times 10^4$  células MeWo-LM2 altamente metastásicas en ratones inmunocomprometidos, y los ratones se trataron intravenosamente 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 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  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo IgG control (20  $\mu$ g/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  $\mu$ m. 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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo IgG control (20  $\mu$ g/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  $\pm$  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  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo IgG control (20  $\mu$ g/mL) a las células endoteliales como se indica, y se dejó que  $1 \times 10^5$  células endoteliales migraran hacia  $5 \times 10^4$  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) Imagen bioluminiscente de metástasis pulmonares por  $5 \times 10^4$  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  $\pm$  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  $1 \times 10^5$  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  $\pm$  SEM. (D) Reclutamiento endotelial por  $5 \times 10^4$  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  $4 \times 10^4$  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

imágenes bioluminiscentes. 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  $\pm$  SEM.

Figura 11. Identificación de miR-7 como un supresor endógeno de metástasis de melanoma. (A) Gráfico de imágenes bioluminiscentes de colonización metastásica pulmonar después de la inyección intravenosa de  $4 \times 10^4$  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  $4 \times 10^4$  células LM2 que sobreexpresan el precursor para miR-7 o una horquilla control. La colonización pulmonar se monitorizó semanalmente por imágenes bioluminiscentes, y los pulmones se extrajeron en el día 77 después de la inyección. n=5. Todos los datos se representan como media  $\pm$  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) Imágenes bioluminiscentes 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 intravenosamente  $4 \times 10^4$  células MeWo-Par/MeWo-LM2 y  $1 \times 10^5$  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  $\pm$  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  $2,5 \times 10^4$  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  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  células endoteliales en una placa de 6 pocillos y se dejó que formaran una monocapa. Se sembraron  $2 \times 10^5$  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 imágenes, y se cuantificó el número de células cancerosas que se adhirieron a las células endoteliales. n=3. (D) Se sembraron  $1 \times 10^6$  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  $5 \times 10^5$  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  $5 \times 10^4$  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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m.

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 de 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  $\pm$  SEM.

5 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) Imaginería bioluminiscente de metástasis pulmonares por  $1 \times 10^5$  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) Imaginería bioluminiscente de metástasis pulmonares por  $4 \times 10^4$  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  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m.

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  $10^4$  células MeWo-LM2 (B) o células endoteliales (C) en presencia de BSA (100  $\mu$ M) o APOE (100  $\mu$ M), 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  $\mu$ M) o APOE (100  $\mu$ M).  $n=3$ . (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  $\mu$ g/mL) o neutralizante de ApoE 1D7 (40  $\mu$ g/mL). Todos los datos se representan como media  $\pm$  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  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  células endoteliales con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control y se dejó que migraran en trans-well hacia 5  $\times 10^4$  células MeWo-LM2 que expresan una horquilla corta control (D;  $n=8$ ) o 5  $\times 10^4$  células MeWo-LM2 inhibidas para miR-199a-5p o una secuencia control (E;  $n=4$ ). Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escala, 100  $\mu$ m.

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  $\times 10^4$  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 intravenosamente 5  $\times 10^5$  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 bisemanalmente.  $n=5-6$ . Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM.

Figura 19. La activación de la señalización de LXR $\beta$  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  $1 \times 10^5$  MeWo,  $5 \times 10^4$  HT-144,  $5 \times 10^5$  SK-Mel-2, y  $5 \times 10^4$  SK-Mel-334.2. Las células se trataron con DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a  $1 \mu\text{M}$  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  $5 \times 10^4$  MeWo, HT-144, SK-Mel-2, y SK-Mel-334.2 para determinar su capacidad de reclutar  $1 \times 10^5$  células endoteliales en un ensayo de migración trans-well, después del tratamiento de las células de melanoma con DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a  $1 \mu\text{M}$  durante 72 horas.  $n=4-8$ . (D-E) Se sometieron las células de melanoma  $1 \times 10^5$  MeWo (D) y  $1 \times 10^5$  HT-144 (E) que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXR $\alpha$*  o *LXR $\beta$*  al ensayo de invasión celular después del tratamiento de las células con DMSO, GW3965, o T0901317 a  $1 \mu\text{M}$  durante 72 horas.  $n=4-12$ . (F-G) Se trataron las células  $5 \times 10^4$  MeWo (F) y  $5 \times 10^4$  HT-144 (G), transducidas con ARNsh lentivirales dirigidos a *LXR $\alpha$*  o *LXR $\beta$*  o un ARNsh control, con DMSO, GW3965, o T0901317 a  $1 \mu\text{M}$  durante 72 horas y se ensayaron para determinar su capacidad de reclutar  $1 \times 10^5$  células endoteliales en un ensayo de migración trans-well.  $n=7-8$ . Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escala,  $50 \mu\text{m}$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

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  $2,5 \times 10^4$  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  $1 \mu\text{M}$ . Las células viables se contaron en el día 5 posterior a la siembra.  $n=3-6$ . (C) Se sembraron en placas  $2,5 \times 10^4$  células MeWo, HT-144, o SK-Mel-334.2 en triplicado y se incubaron en medio que contenía DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a  $1 \mu\text{M}$  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 *LXR $\alpha$*  y *LXR $\beta$* , 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 *LXR $\alpha$*  o *LXR $\beta$* . Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM.

Figura 21. La activación terapéutica de LXR inhibe el crecimiento tumoral del melanoma. (A-B) Crecimiento tumoral primario por  $5 \times 10^4$  células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de  $5-10 \text{ mm}^3$ , los ratones se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 ( $20 \text{ mg/kg/día}$  o  $100 \text{ mg/kg/día}$ ) (A) o T0901317 ( $20 \text{ mg/kg/día}$ ) (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  $1 \times 10^6$  MeWo (C),  $7,5 \times 10^5$  SK-Mel-334.2 (D), y  $2 \times 10^6$  SK-Mel-2 (E) inyectadas subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de  $5-10 \text{ mm}^3$ , los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 ( $20 \text{ mg/kg}$  o  $100 \text{ mg/kg}$ , según se indica). Las imágenes tumorales mostradas corresponden al último día de mediciones.  $n=6-34$  (C),  $8$  (D),  $5$  (E). (F) Se inyectaron subcutáneamente  $5 \times 10^4$  células B16F10 en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta  $150 \text{ mm}^3$ , los ratones se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 ( $150 \text{ mg/kg}$ ), y el crecimiento tumoral se midió diariamente.  $n=6-13$ . (G-I) Supervivencia global de los ratones después del injerto subcutáneo de las células  $5 \times 10^4$  B16F10 (G),  $1 \times 10^6$  MeWo (H), y  $7,5 \times 10^5$  SK-Mel-334.2 (I) en ratones a los que se administró un pienso normal o un pienso suplementado con GW3965 ( $100 \text{ mg/kg}$ ) después de la formación de los tumores que tenían un volumen de  $5-10 \text{ mm}^3$ .  $n=6-9$  (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 escudida (L), en tumores de melanoma subcutáneos formados por  $1 \times 10^6$  células de melanoma humano MeWo en respuesta al tratamiento de los ratones con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) durante 35 días.  $n=5$ . El volumen tumoral se calculó como  $(\text{diámetro pequeño})^2 \times (\text{diámetro grande})/2$ . Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escalas,  $5 \text{ mm}$  (A-D),  $50 \mu\text{m}$  (J, K),  $25 \mu\text{m}$  (L).

Figura 22. El agonismo de *LXR $\beta$*  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 ( $20 \text{ mg/kg/día}$  o  $100 \text{ mg/kg/día}$ ) o T0901317 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) 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 ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 48 horas y se inyectaron intravenosamente  $4 \times 10^4$  células a través de la vena de la cola en ratones NOD Scid. La colonización pulmonar se monitorizó por imagenología bioluminiscente semanalmente. Se muestran los pulmones teñidos con H y E representativos que corresponden al día final (d70).  $n=4-5$ . (B-C) Imagenología bioluminiscente de metástasis pulmonares por  $4 \times 10^4$  células MeWo inyectadas intravenosamente en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) o T0901317 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) empezando 10 días antes de la inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de imagenología  $n=5-6$ . (B-C) Imagenología bioluminiscente de metástasis pulmonares por  $4 \times 10^4$  células MeWo inyectadas intravenosamente en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) o T0901317 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) empezando 10 días antes de la

inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de imaginería n=5-6. (F) Flujo fotónico sistémico y cerebral después de la inyección intracardiaca de  $1 \times 10^5$  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 imaginería 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 ( $\sim 300 \text{ mm}^3$  de volumen) formados por  $1 \times 10^6$  células de melanoma MeWo. También se muestran los pulmones representativos teñidos para vimentina humana. n=7-9. (I) Se inyectaron intravenosamente  $4 \times 10^4$  células MeWo en ratones NOD Scid. Después del inicio de las metástasis, detectadas por imaginería 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  $4 \times 10^4$  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  $\pm$  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; Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup>* 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; Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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; Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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  $1 \times 10^5$  células de melanoma primario *Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>* en ratones C57BL/6-WT singénicos. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10  $\text{mm}^3$ , 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 subcutáneamente  $1 \times 10^5$  células de melanoma *Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>* 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  $\text{mm}^3$ . n=7-8. (F) Colonización pulmonar por  $1 \times 10^5$  células de melanoma primario *Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>* inyectadas intravenosamente 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  $\pm$  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; Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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; Bra<sup>f</sup><sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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 LXR $\beta$  induce la expresión de *ApoE* en células de melanoma; ApoE media la supresión dependiente de LXR $\beta$  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  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. n=3-4. (E-F) Se ensayaron  $5 \times 10^4$  células HT-144, tratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a cada trans-well al inicio del ensayo. n=4. (G-H) Invasión celular (G) y reclutamiento endotelial (F) por  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  células MeWo, respectivamente, que expresan un ARNsh control o un ARNsh dirigido a *ApoE* y tratadas con DMSO o GW3965 a 1  $\mu\text{M}$  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 *LXR $\alpha$*  o *LXR $\beta$*  y tratadas posteriormente con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1  $\mu\text{M}$  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 *LXR $\alpha$*  o *LXR $\beta$*  y tratadas con

DMSO o GW3965 a 1  $\mu$ M durante 72 horas. n=3. Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

Figura 28. La activación de LXR $\beta$  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  $\mu$ M 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  $\mu$ M durante 72 horas. n=3-4. (C) Invasión celular por 1 x 10<sup>5</sup> células MeWo pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1  $\mu$ M durante 72 horas. Al inicio del ensayo, se añadió un anticuerpo neutralizante de ApoE (1D7) o un anticuerpo IgG control a 40  $\mu$ g/mL a cada trans-well, como se indica. n=7-8. (D) Se ensayaron 5 x 10<sup>4</sup> células MeWo, pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1  $\mu$ M durante 72 horas, para determinar su capacidad de reclutar 1 x 10<sup>5</sup> células endoteliales en presencia de los anticuerpos 1D7 o IgG a 40  $\mu$ g/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  $\mu$ M durante 72 horas. n=4. (F-G) Se sometieron 5 x 10<sup>4</sup> células SK-Mel-334.2, pretratadas con GW3965 a 1  $\mu$ M durante 72 horas, a los ensayos de invasión celular (F) y reclutamiento endotelial (G) en presencia de anticuerpos 1D7 o IgG a 40  $\mu$ g/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 LXR $\alpha$  o LXR $\beta$  en presencia de DMSO o GW3965 (1  $\mu$ M) 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 LXR $\alpha$  o LXR $\beta$  en respuesta al tratamiento con GW3965 o T0901317 (1  $\mu$ M) durante 72 horas. n=3-8. Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

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<sup>3</sup>, 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 LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , y *ApoE* se determinaron por qRT-PCR en células de melanoma de ratón B16F10 que expresan una horquilla control o un ARNsh dirigido a LXR $\alpha$  (sh\_mLXR $\alpha$ ), LXR $\beta$  de ratón (sh\_mLXR $\beta$ ), o *ApoE* de ratón (sh\_mApoE). (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 LXR $\beta$  de ratón o *ApoE* de ratón. Las células se trataron con DMSO o GW3965 a 5  $\mu$ M durante 48 horas. n=3. (I) Niveles de ARNm de ABCA1, medidos por qRT-PCR, en células sanguíneas blancas sistémicas extraídas de ratones LXR $\alpha$  -/- o LXR $\beta$  -/- 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 LXR $\beta$  suprime el crecimiento tumoral y metástasis del melanoma mediante la inducción de la expresión de *ApoE* derivada de melanoma y sistémica. (A) Mediciones por transferencia Western 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 subcutáneamente células control B16F10 o células B16F10 que expresan ARNsh dirigidos a LXR $\alpha$  de ratón (sh\_mLXR $\alpha$ ) o LXR $\beta$  de ratón (sh\_mLXR $\beta$ ) en ratones C57BL/6-WT, LXR $\alpha$  -/- o LXR $\beta$  -/-. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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 LXR $\alpha$  -/- o LXR $\beta$  -/- 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<sup>4</sup> células control B16F10 o células B16F10 que expresan un ARNsh dirigido a *ApoE* de ratón (sh\_mApoE) en ratones C57BL/6-WT o *ApoE* -/-. Después de la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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<sup>4</sup> células B16F10

transducidas con un ARNsh control o *sh\_mApoE* e inyectadas intravenosamente en ratones C57BL/6-WT o *ApoE*<sup>-/-</sup>. 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 imagenología 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<sup>4</sup> 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<sup>4</sup> células parentales B16F10 sensibles a DTIC (B) o 5 x 10<sup>4</sup> células B16F10 resistentes a DTIC (C) inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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 subcutáneamente 5 x 10<sup>5</sup> células en ratones NOD Scid gamma. Después de la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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<sup>6</sup> células SK-Mel-239 de clon resistente a vemurafenib inyectadas subcutáneamente 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<sup>3</sup>. n=7-8. (H) Supervivencia global de los ratones después del injerto de 2 x 10<sup>6</sup> células SK-Mel-239 resistentes a vemurafenib. Después del crecimiento de los tumores hasta un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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<sup>5</sup> células parentales MeWo sensibles a DTIC inyectadas subcutáneamente en ratones Nod SCID gamma. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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<sup>4</sup> células de melanoma uveal humano MUM2B y OCM1, (C-E) 5 x 10<sup>4</sup> células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-231, MDA-468, y BT 549, (F-G) 5 x 10<sup>4</sup> células de cáncer pancreático humano PANC1 y BXPC-3, y (H-I) 5 x 10<sup>4</sup> 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<sup>4</sup> células de cáncer renal humano RCC (A), 5 x 10<sup>4</sup> células de cáncer pancreático humano PANC1 (B), y 5 x 10<sup>4</sup> 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  $2 \times 10^6$  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  $\pm$  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  $1 \times 10^5$  células de melanoma humano MeWo pretratadas con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 a  $1 \mu\text{M}$  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  $5 \times 10^4$  células MeWo pretratadas con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej.9, o SB742881 a  $1 \mu\text{M}$  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  $\pm$  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  $5 \times 10^4$  células de melanoma de ratón B16F10 inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad. Después de que los tumores alcanzaran un volumen de 5-10 mm<sup>3</sup>, 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  $\pm$  SEM.

## Descripción detallada de la invención

La presente descripción presenta métodos para prevenir o reducir la proliferación, diferenciación, o supervivencia aberrante de células. Por ejemplo, los compuestos de la descripción 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 descripción 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 tumorigénesis y metástasis de otros tipos de cáncer (Hatzia Apostolou 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 desrepresión 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

5 escenario, a diferencia de la delección 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.

10 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 desregulado 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

15 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

20 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 mecanística 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

25 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)**

gggatccttgagtcctactcagcccagcggaggtgaaggacgtccttcccaggagccgactggccaatcacaggcaggaag  
 atgaagggttctgtggctgctgtggtcacattctggcaggatgccaggccaaggtggagcaagcgggtggagacagagcc  
 ggagcccagctgcccagcagaccgagtgaggagcggccagcgtgggaactggcactgggtcgttttgggattacctg  
 cgctgggtgcagacactgctgagcaggtgcaggaggagctgctcagctcccagggtcaccaggaactgagggcgctgatgg  
 acgagaccatgaaggaggtgaaggcctacaatcggaactggaggaacaactgaccccgggtggcggaggagacgcgggcac  
 ggctgtccaaggagctgcagggcggcgcaggccggctgggcccggacatggaggacgtgtgcccgcctggtgcagtacc  
 gcggcgaggtgcaggccatgctcggccagagcaccgaggagctgcccgggtgcgcctgcctcccactgcgcaagctgcgtaa  
 gcccgtcctcccgatgccgatgacctgcagaagcgcctggcagtgatgaccaggccggggcccgcgagggcgccgagcgcg  
 gcctcagcggccatccgcgagcgcctggggcccctggtggaacagggccgcgtgcccggccactgtgggctcccctggccg  
 gccagccgctacaggagcgggcccaggcctggggcgagcggctgcccgcggatggaggagatgggcagccggaccgg  
 cgaccgctggacgaggtgaaggagcaggtggcggaggtgcccgcgaagctggaggagcagggccagcagatacgcctgc  
 aggccgagccctccaggcccgcctcaagagctggttcagcccctggtggaagacatgcagcggcagtgggccgggctggt  
 ggagaagggtgcaggctgccgtgggcaccagcggcccccctgtgccagcgacaatcactgaacgccgaagcctgcagccatg  
 cgaccccacgccacccctgctcctgcctcgcgcagcctgcagcgggagaccctgtccccgcccagccgctcctctgggg  
 30 tggaccctagtttaataaaagattcaccaaagtttcacgcaaa

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

mkvlwaallv tflagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelalgr fwdylrwvqt lseqvqeell  
 ssqvtqlra lmdetmkelk aykseleeql tpvaeetrr lskelqaaqa rlgadmedvc grlvqyrgev  
qamlgqstee lrvrflashlr klrkrllrda ddlqkrlavy qagaregaer glsairerlg plveqgrvra atvgsлагqp  
 lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrldv keqvaevrak leeqaqqirl qaeafqarlk swfeplvedm  
 qrqwaglvk vqaavgtsaa pvpsdnh

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



marggsqsws sgesdgqpke qtpekprhkm vketqyydil gvkpsaspee ikkayrkjal kyhpdknpe  
gekflisqa yevlsdpkkr dvydqggeqa ikeggsgsps fsspmdifdm ffggggrmar errgknvvhq  
lsvtledlyn gvtkkjalqk nvicekcegv ggkkgsvekc plckgrgmqi hiqqigpgmv qqiqtvciec  
kgqgerinpk drcescsgak virekkiiev hvekgmkgdq kilfhgedq epelepgdvi ivldqkdhsv  
frrghdim kmkiqlseal cgfkktiktl dnrlvitsk agevikhgdI revrdegmpi ykaplekgil iiqflvifpe  
khwlsleklp qleallpprq kvritddmdq velkefcpe qnwrqhreay eededgpqag  
vqcqta

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

gugaccgugacgcgcgagcggcgggcgggggcgcgggccagggcgcgggccagggugccggcagggggcguccgg  
ggcgcucugaccggccucgcccggccccggcagacacaagauggugaaggagaccaguacuauagacaucugggc  
gugaagcccagcgcgucggggaggagaucaagaaggccuauagggaagcuggcgcucaaguaccacgggacaagaac  
ccggaugagggcgagaaguuuaacucauauccaggcauugaagugcuuucagaucuaaagaaaagggauguuuu





mwesltldsg qisaltrfkl isqayevlsd pkkrdvydqg geqaikeggs gspsfsspmd ifdmffgggg  
 rmarerrgkn vvhqlsvtle dlyngvtkkl alqknvicek cegvvgkkgs vekcplckgr gmqihiqig  
 pgmvqqiqtv cieckgqger inpkdrcesc sgakvirekk iievhvekkm kdgqkilfhg egdqepelep  
 gdviivldqk dhsvfqrrgh dlimkmkiql sealcgfkkk iktldnrilv itskagevik hgdLrcvrde gmpiykaple  
 kgiliiqflv ifpekhwlsl eklpqlleall pprqkvritd dmdqvelkef cpneqnwrqh reayededg  
 pqagvqcqta

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

cagcggugcagcuccaggcccaugcacugaggaggcgaaacaaggggagccccagagcuccaucaagccccucc  
 aaaggcuccccuacccgguccacgccccccacccccuccccgcccucccaauugugcauuuuugcagccggagg  
 cggcuccgagauggggcugugagcuucgcccggggagggggaaagagcagcagaggagugaagcgggggggugggg  
 ugaaggguuuggauuucggggcagggggcgcaccccgucagcagggccuccccaaggggcucggaacucuaccuc  
 uucacccacgccccuggugcgcuuugccgaaggaaagaauaagaacagagaaggaggagggggaaaggaggaaaagg  
 gggaccccccaacuggggggggugaaggagagaaguagcaggaccagagggggaaggggcugcugcuugcaucagcc  
 cacaccaugcugacccccgcuugcuccugcugcugccccugcucucagcucuggucgcgccgcuauagcagcccc  
 uaagacuugcagccccagcaguuuugccugcagagaucaaaauaaccuguaucuaaagggcugccggugcagcggug  
 agagggacugcccagacggauucugacgagggcccugagauuuguccacagaguaaggcccagcgaugccagccaaac  
 gagcauaacugccugguacugagcuguguguucccauguccgcccucugcaaugggguccaggacugcauggacg  
 gcucagauagggggcccacugccgagagcuccaaggcaacugcucucgcccugggcugccagcaccuugugucucc  
 acacucgauggggcccaccugcuacugcaacagcagcuuucagcuucaggcagauggcaagaccugcaaaaguuuuga  
 ugagugcucagugacggcaccugcagccagcuauagcaccacacagacggcuccuucuauguggcuguguugaag  
 gauaccuccugcagccggauaacggcuccugcaaggccaagaacgagccaguagaccggccccucugcuguugaua  
 gccaacuccagaacaucuuuggccacguaccugagugggggcccaggugucuaccaucacaccuacgagcagcggcag  
 accacagccauggacuucagcuauugccaacgagaccguauugcugggugcauguuuggggacagugcugcucagacgca  
 gcuaagugugcccgcaugccugggccuaaagggcuuuguggaugagcacaccaucaacaucuccucagucugcacc  
 acguggaacagauggccaucgacugggcugacagggcaacuucuaacuuguggaugacaucgaugauaggauuuugu  
 cugcaacagaaauggggacacaugugucacauugcuagaccuggaacucuaacaccccaggggcauugcccuggacc  
 ugccauggggaaagguguuuuuucacugacuauugggcagauccaaagguggaacgcugugacauggaugggcagaac  
 cgcaccaagcucgucgacagcaagauuguguuuuccuauugcaucacgcuggaccuggucagccgcuugucucug  
 ggcaugccuauucggacuauauugaagugggacuaugagggcaaggggcggccagaccucauaccaggggcaucc  
 ugauugagcaccuguaaccggccugacuguguuuagagaauuauucuaugccaccaacucggacaauugccaauggccag  
 cagaagacgagugugauccgugugaaccgcuuuaacagcaccgaguaccagguugucacccggguggacaaggggug  
 gugccuccacaucaaccaccagaggcgucagccccgagugaggagccaugccugugaaaacgaccaguaugggaag  
 ccggguggcugcucugacaucugccugcugggccaacagccacaaggcgccgaccugccgcugccguuccggcuucag  
 ccugggcagugacgggaagucaugcaagaagccggagcaugagcuguuccucguguauggcaagggccggccaggc  
 aucauccggggcauggauauugggggccaagguccggauagacacaugauccccauugaaaaccucaugaacccccg  
 agcccuggacuuccacgcugagaccggcuucaucuaacuugccgacaccaccagcuaccucauuggccgccaagaagau  
 ugauggcacugagcgggagaccuaccugaaggacggcauccacaauugggagggguguggccguggacuggaugggga  
 gacaucuguaucuggacggcgauggggccaaaaagacaauacagcugggccaggcuggagaaagcugcucagacccg  
 caagacuuaaaucgagggcaaaaugacacaccccagggcuaauuguggggauccacucaauuggguggauguaucugga  
 cagacuggggaggagaccccaaggacagucggcgugggcgccguggagaggggcugggauuggauggcucacaccgaga  
 cauuuugucaccuccaagacagugcuuuggccaaugggcuaagccuaggacaucccggcugggcgccucuaucuggg  
 uggaugccuucacgaccgaucgagacgauacgucuaauggcacagaccggaagauuguguaugaagguccugag  
 cugaaccacgccuuuggccugugucaccauggcaacuaccucucuggacugagauucggaguggcagugucuaacc  
 gcuuuggaacgggguguaaggagggcgacccccacugugaccuucugcgcagugagcggcccccaucuuugagauc  
 cgaauguaugaucccagcagcagcaaguuggcaccacaauauggccgggugaacaauggcgccgucagcagccugug  
 cuuggccaccccugggagccgcccagugcgcucugagaggaccagguguuggacgcagacggcgucacuugcuug

gcgaacccauccuacgugccuccaccccagugccagccaggcgcaguuugccugugccaacagccgcugcauccaggag  
 cgcuggaagugugacggagacaacgauugccuiggacaacagugaugaggccccagcccucugccaucagcacaccug  
 cccucggaccgauucaagugcgcagaacaaccggugcauccccaaccgcuggcucugcgcaggggacaauagacugug  
 ggaacagugaagaugaguccaaugccacuuguucagcccgcaccugccccccaaccaguucuccugugccaguggc  
 cgcugcauccccaucuccuggacgugugaucuggaugacgacuguggggaccgcucugaugagucugcuucgugug  
 ccuauccaccugcuucccccugacucaguuuaccugcaacaauggcgauguaucacaucacucuggagaucgaca  
 augacaauagacuguggggacaacagugacgaagccggcugcagccacuccuuguucuaagcaccaguucaagugcaac  
 agcggggcguugcauccccgagcacuggaccugcgauggggacaauagacugcggagacuacagugaugagacacagc  
 caacugcaccaaccaggccacgaggccccucgguggcugccacacugaugaguuccagugccggcuggauggacuau  
 gcaucccccugcggugggcgcugcgauggggacacugacugcgauggacuccagcgaugagaagagcugugagggagu  
 gaccacgucugcgauccagugucaaguugggcugcaaggacucagcucggugcaucagcaaaagcugggugugu  
 gauggcgacaauagacugugaggaauaacucggacgaggagaacucgcgagucccuggccugcaggccaccucgaccc  
 uugugccaacaacaccucagucugccugccccugacaagcugugugauggcaacgacgacuguggcgcagggcucag  
 augagggcgagcucugcaccagugcucucugaauaacgguggcugcagccacaacucgucaguggcaccuggcgaa  
 ggcauuguguguuccugcccucugggcauggagcugggggcccgacaaccacaccugccagauccagagcuacugugc  
 caagcaucuaaaugcagccaaaagugcgcaccagaacaaguucagcguagaagugcuccugcuacgaggggcuggucc  
 uggaaaccugacggcgagagcugccgcagccuggaccccucaagccguucaucauuucuccaaccgccaugaaauc  
 cggcgcaucgaucuucacaaaaggagacuacagcguccuggugcccggccugcgaacaccaucgcccuggacuuccac  
 cucagccagagcggcccucacuggaccgacguggugggagacaagaucuaccgcccgaagcugcuggacaaccggagc  
 ccugacuaguuucgagguggugauucagauuggccugccacaccggggccuggcuguagacuggaaugcagggc  
 aacaucuacuggguggagaguaaccuggaucagauccaggguggccaagcuggaugggaccuccggaccaccucgu  
 ggccggugacaauagacacccaaggggcaaucgcacuggauccccgggaugggaucucuuuggacagacugggau  
 gccagccugccccgcauugaggcagccuccauggagugggggcugggcgccgaccgugcaccgggagaccggcucugg  
 gggcugggccaacgggcucaccguggacuaccuggagaagcgaucuuuggauugacgccaggucagaugccaau  
 uacucagcccguuacgacggcucuggccacauggaggugcuucggggacacgaguuccugcgcacccguuugcag  
 ugacgcuguacggggggggaggucacuggacugacugggcgaacaaacacacuggcuaaggccaacaaguggaccggc  
 cacaauugcaccgugguacagaggaccaacaccagccuuugaccugcagguguaaccacccucccggcagcccaug  
 gcucccaaucccugugaggccaauuggggggccaggggcccugcuccaccugugucucaucaacuacaaccggaccgu  
 guccugcggcugccccaccucaugaagcuccacaaggacaacaccaccugcuauagauuuuaagaaguuccugcugua  
 cgcacgucagauggagauccgagguguggaccuggaugcucccuacuacaacuacaucuccuucacggugcccg  
 acaucgacaacgucacagugcuagacuacgaugcccgcgagcagcugugugacugggucugacgugcggacacaggcc  
 aucaagcggggccuucacaacggcacaggcugggagacagucgucucugcagacuugccaaaugcccacgggcuggc  
 uguggacugggucuccgaaaccuiguucuggacaagcuauagacaccaauaagaaagcagaucuauguggcccggcugg  
 auggcuccuucagaacgcagugggcagggccuggagcagcccauugccuugucguccaccucugcuggggaa  
 gcucuacuggaccgauggugacaacauacgcauggccaacauuggaugggcagcaaucgcaccucgucucucaguggcc  
 agaagggccccgugggcccuggcuaauagacuucccugaaagcaaacucuaucuggaucagcuccgggaaccuauaccauc  
 aaccgcugcaaccuggauggggagugggcugggaggucaucgaugccaugcggagccagcugggcaaggccaccgccc  
 ggccaucaugggggacaagcuguggugggcugaucaggugucggaaaagaugggcacaugcagcaaggcugacggc  
 ucgggcuccgugguccuucggaacagcaccaccucggugaugcacaugaaggucuaugacgagagcauccagcugga  
 ccuaaagggcaccaaccucgacugucaacaacggugacugcuccagcucugccugcccacgucagagacgaccgg  
 cuccugcaugugcacagccggcuauagccuccggagugggcagcagccugcgaaggcguagguuccuuucuccug  
 uacucugugcaugagggaauacggggaaaucccuggaucccaauagacaagucagaugccuugguccaguguccgg  
 gaccucgucggcugucggcaucgacuuccacgcugaaaaugacaccaucuaucugggugggacauggggccugagcacga  
 ucagccgggccaagcgggaccagacguggcgugaagacguggugaccaauggcauuggccgugugggaggccauugc  
 aguggacuggaucgcaggcaacaucuaucuggacagaccaggccuuugaugucaucgaggucgcccggcucuauggc  
 uccuuccgcuacguggugaucuccagggucaagacaagccccgggccaucaccguccaccggagaagggguacu  
 guucuggacugaguggggucaguauccgcguauugagcggucucggcuagauggcacggagcugugggucguggu

caacgucagcaucagcuggcccaacggcaucucaguggacuaccaggaugggaagcuguacuuggugcgaugcacgga  
 cagacaagauugaacggauccgaccuggagacaggugagaaccgagaggugguucuguccagcaacaacauaggacaug  
 uuuucagugucuguguuugaggauuucacucacuggagugacaggacuaucccaacggcucuaucuaagcgcggga  
 gcaaagacaaugccacagacuccgugccccugcgaaccggcaucggcguccagcuuaaagacaucuaaagucuucaacc  
 gggaccggcagaaaaggcaccacgugugcgcgguggccaauggcgggugccagcagcugugccuguaccggggccg  
 ugggcagcgggcccugcgcugcccacgggaugcuggcugaagacggagcaucgugccgcgaguauccggcuac  
 cugcucuaucagagcgcaccuuucuaagagauaccucugcggauagagcgaaccucaauggcggccgugcagccc  
 uucgaggaccucugagcacaugaagaacgucacucgcccuggccuuugacuaccgggcaaggcaccucuccgggacccc  
 caaucgcaucuuucagcagcauccacuuugggaacaucacaacagaucaacgacgauggcuccaggaggauccacau  
 uguggaaaacgugggucuccguggaaggccuggccuauaccguggcugggacacucucuaauuggacaagcuacacg  
 acauccaccaucacgcccacacaguggaccagaccgcccaggggcuucgagcugagaccgucacuaugucu  
 ggagauagaccaccacgggcuucguuuuggagagugccagaaccucauguucuggaccaacuggaauagagcagca  
 ucccagcaucaugcgggcccgcucucgggagccaauguccugaccuuauccgagaaggacaucguaaccccaaug  
 gccuggccaucgaccaccgugccgagaagcucuaucucugacgccaccucggacaagaucgagcggugcagauau  
 gacggcuccaccgcuaugugauccuaaagucagagccuguccaccuccuucgggcuuggccguguauggggagcaca  
 uuucuggacugacugggugcggcgggagugcagcgggccaacaagcagcugggcagcaacaugaagcugcugcgc  
 guggacaucuccccagcagcccaugggcaucaucgcccugggccaacgacaccaacagcugugaacucucuccaugccga  
 aucaacaacgguggcugccaggaccugugucugcucacucaccagggccaugucaacugcucuaugccgagggggccg  
 aauccuccagggaugaccucaccugcccagcgggugaauuccucugccgagcacaagauagauuuugaguguccaau  
 gcgagugcaucaacuacgcccugaccugcagcggcgucccccacugcaaggacaaguccgaugagaagccaucucua  
 gcaacuccccgcccugcaagaagacuuccggcagugcagcaauggggcgcuguguguccaacauccuguggugcaac  
 ggggcccagcagcuguggggauggcucugacgagaucccuugcaacaagacagccuguggugugggagcuuccgcu  
 gccgggacgggaccugcaucgggaacuccagccgucgcaaccaguuuguggauugagggagcgcucagauagau  
 gaacugcagugccaccgacugcagcagcuaucuccgcccugggcgugaaggggcugcucucuccagcccugcagcggga  
 ccucacucugcuaacgaccagcugggugugugauggcgccaauagacuguggggacuacagugaugagcgcgacug  
 cccaggugugaaacgcccagaugccucugaauuacuucgccugcccuagugggcccugcaucucccaugagcugga  
 cgugugacaaagaggauagacugugaacauggcgaggagaccacugcaacaaguucugcucagagggcccaguuu  
 gagugccagaaccaucgucgcaucuccaagcaguggcugugugacggcagcgaugacuguggggauggcucagacg  
 aggcugcucacugugaaggcaagacgugcggcccuccucucuccugcccuggcaccacagugugcugccccgag  
 cgcuggcucugugacggugacaagacugugcugauggugcagacgagagcaucgagcugguugcuuguaaca  
 gcacuugugacgaccgugaguuaugugccagaaccgagugcaucccaagcacuucgugugugaccagaccgug  
 gacugugcagauggcucugauagauccccgagugugaguaccggaccugcggcccagugaguuccgucugucca  
 augggcgcugucugagcuccgcccagugggagugugauggcgagaauagucgaccagaccagagugacgagggcucc  
 caagaaccacacugcaccagccaagagcacaagugcaaugccucgucacaguuccugugcagcagugggcccugug  
 uggcugaggcacugcucugcaacggccaggauagacugggcgacagcucggagcagcugggcugccacaucauga  
 gugucucagcccgaagcucaguggcugcagccaggacugugaggaccucaagaucggcuucaauguccgucugccc  
 cuggcuuccggcugaaggacgacggccggacgugugcugauguggagcagugcagcaccaccuuccccugcagccag  
 cgcugcaucaacacucauggcagcuaaagugucuguguguggagggcuauagcaccggcggcgacccccacag  
 cugcaaggcugugacugacgaggaaccguuucugaucuucgccaaccgguaacuaccugcgaagcuaaccuggacg  
 gguccaacuacacguuacuuaagcagggccugaacaaccgcuugccuuggauuuugacuaccgagagcagaugauc  
 uacuggacagauugaccaccagggcagcaugaucgaaaggauccaccuuacgggagcaauugcagguccuaca  
 ccguacagggccucagcaaccccgaugggcuuggcuguggacugggugggggcaaccuguaucuggugcagaaaggc  
 cgggacaccaucgagguguccaagcuaauuggggccuauccggacggugcuggucagcucuggccuccgugagccca  
 gggcucugggugggauugcagaauuggguaccuugacugggacagacuggggugaccuucacugaucggccgcau  
 cggcauggauggguccagccgagcugcaucguggacaccaagaucacauggcccaauuggccugacgcuggacuau  
 ucacugagcgcuaucucgggcccagcggccgagggacuacauugaauuugccagccuggauggcuccaauccgccc  
 guugugcugagccaggacaucggcacaucuuugcagaccucuuugaggacuacgucuaucuggaccgacuggg

aaacaaaguccauuaaccgagcccacaagaccacgggcaccaacaaaacgcuccucaucagcacgcugcaccggccc  
 ggaccugcaugucuuccaugcccugcgcagccagacgugcccuaucaccccugcaaggucaacaauagguggcugca  
 gcaaccugugccugcugucccccgggggagggcacaauugugccugcccaccaacuucuaaccugggcagcgauggg  
 cgcaccuguguguccaacugcacggcuagccaguuuguauugcaagaacgacaagugcauucccuucuggguggaagug  
 ugacaccgaggacgacugcggggaccacucagacgagccccggacugcccugaguuaagugccggcccggacagu  
 uccagugcuccacagguauucgacaaaaccugccuuaucugcgauggcgacaauagacugccaggacaacagugac  
 gaggccaacugugacauccacgucugcuugcccagucaguuaaaugcaccaaccaaccgcuguauuccggcauc  
 uuccgcugcaauaggcaggaacaacugcggagauggggagggaugagaggggacugcccggaggugaccugcgcccca  
 ccaguuccagugcuccauuacaaacggugcaucccccgggucugggucugcaccgggacaauagacugugggau  
 ggcagugaugagcccgccaacugcaccagauaccugugugugggacgaguuccgcugcaaggauucggggccgu  
 gcaucccagcgcguuggaagugugacgggagaggauagacugugggggauggcucggauagcccaagggaaguguga  
 ugaacgcaccugugagccauaccaguuccgcugcaagaacaaccgcugcugcccggccgugggcagugcgaucg  
 acaacgauugcggugacaacuccgaugaagagagcugcaccucggcccugcuccgagagugaguucuccugugcc  
 aacggccgucgcaucgcggggcgcuggaaugcgauggagaccacgacugcggcggacggcucggacgagaaagacug  
 cccccccgucugugacauggaccaguuccagugcaagagcggccacugcauuccccugcgcugggcgcugugacgag  
 acggcgacugcauggacggcagcagcagggaggccugcggcaccugggcugcggaccugccccugggacgaguuccag  
 ugcaacaacaccuugugcaagccgucggccuggaugcgauggcggaggaugacuguggggacaacucagaugagaa  
 ccccgaggagugugcccgguuucgugugcccuccaaccggccuuccguugcaagaauagaccgcgucugucugugg  
 aucggggcgaauugcgauggcaccggacaacuguggggaugggacugaugaaagaggacugugagccccccacagcca  
 caccaccacugcaaaagacaagaaggaguuuucugugccggaaccagcgcugccucuccuccuccugcgcugcaacu  
 guucgaugacugcggggacggcucugacgaggaggacugcagcaucgacccaagcugaccagcugcgcaccaauug  
 ccagcaucuguggggacgagggcacgcugcgcaccgagaaaagcggccuacugugccugcccgcugggcuuccac  
 accgugcccggccagcccggaugccaaagacaucacagagugccugcgcuuucggcaccugcuccagcucugcaacaac  
 accaagggcggccaccucugcagcugcgcucggaaucuaugaagacgcacaacaccugcaaggccgaaggcucugag  
 uaccagguccuguaucgcugaugacaauagauaccgagccuguucccggccacccccauucggcuuacgagca  
 ggcauuccagggugacgagagugucccauugaugcuauuggauguccauugcaaggcugcccgugucuaauuggacc  
 aacugggcacacggggcaccuuccuaccgagccugccaccugcugcgcuccuaccacuuccaaccgcccaccggcga  
 cagauugaccggggugucaccaccucaacauuucagggcugaagaugcccagaggcaucgccaucgacugggugggc  
 cggaaaacguguaucggaccgacucgggcccagauugauugaggugggcagauugaaggggcagaaccgcaagacg  
 cucaucucgggcaugauugacgagccccacgccauugggugggaccacugagggggaccuugacugggucagacu  
 ggggcaaccacccaagauugagacggcagcgauggaugggacgcuucgggagacacugggugcaggacaacaucag  
 uggcccacagggccugggcuggaauuacacaauagagcggcuguaucugggcagacgccaagcuuucagucacggcag  
 cauccggcucaauuggcacggacccccauugggcugcugacagcaaacgaggccuaagucaccccuucagcaucgacg  
 ucuuugaggaauacaucuauggugucaccuacaucuaauaauugugucuuaagaucuaaaguuuggccacagcccc  
 uuggucaaccugacagggggccugagccacgccucugacgugguccuuuaccuacagcacaagcagcccgaagugac  
 caaccuagugaccgcaagaaugcgaguggcucugccugcugagccccaguggccugucugcaccugucccaauug  
 ggaagcggcuggacaacggcacaucgugccugugcccucuccaacgccccccagaugcuccccggccuggaaccu  
 guaaccugcagugcuuaacgguggcagcuguuuccuuaugcacggagggcagcccagugccgcugccaaccccgc  
 uacacgggugacaagugugaacuggaccagugcugggagcagucgcaaugggggaccugugcugccuuccccu  
 cuggcaugcccacgugccggugcccacgggcuucacgggccccaaugcacccagcagguugugcgggcuacugu  
 gccaacaacagcaccugcagucuaaccagggaaccagccccagugcccgaugccuacccggcuuccugggcagccgc  
 ugccaguaccggcagugcucugggcuacugugagaacuuuggcacaugccagauggcugcugauggcuuccgacaau  
 gccgucgacugccuacuugagggaucgaggugugaggugaacaagugcagccgcugucucgaagggggccugugu  
 gguaacaagcagaguggggauugcaccugcaucgacggauggccggguggccccagcugucugaccugcugc  
 ggccacugcagcaauggcggcuccuguaaccaugaacagcaaaaugaugccugagugccagugcccacccccacaugaca  
 gggccccggugugaggagcagcucucagccagcagcagccaggacaauaagccuuccauccuaaucccucugcuguu  
 gcugcugcugcugguucuggggccggagugguaauucugguaaagcggcgaguccaaggggcuagggcuucca



hrgwdtlywt syttstirh tvdqtrpgaf eretvitmsg ddhprafvld ecqnlmfwtm wneqhpsimr aalsganvlt  
 liekdirtpn glaidhraek lyfsdatldk ierceydgsh ryvilksepv hpfglavyge hifwtdwvrr avqrankhvg  
 snmklrvdi pqqpmgiav andtnscels perinnngc q dlcllthqgh vnscrggri lqddlterav nsscraqdef  
 ecangecinf sltedgvphc kdkdekspsy cnsrckktf rqcnsgrvsv nmlwengadd cgdgsdeipc  
 nktacgvgef rcrdgtcign ssrenqfvc edasdemncs atdcassyfrl gvkgvlfqpc ertsleyaps  
 wvedgandcg dysderdcpv vkrpreplny facpsgrcip mswtedkedd cehgedethc nkfcseaqfe  
 cqnhriskq wlcgdsddeg dgsdeaahce gktcgpssfs cpgthvevpe rwlcgdgkdc adgadesiaa  
 gclynstedd refmcqnrqc ipkhfvcdhd rdcdagdsdes peceyptcgp sefrcangrc lssrqwecdg  
 endchdqsd apknphctsq ehkcncassqf lcssgrvac allengqddc gdssdergch inecsrkls  
 gesqdecdlk igfkrerpq frlkddgrtc advdecsttf pesqreinth gsykclveg yaprggdphs ckavtdeepf  
 lifanryylr klnldgsnyt llkqglnav aldfdyreqm iywtdvttqg smirrmhng snvqvlhrtg lsnpdglavd  
 wvggnlywcd kgrdtievsk lngayrtvlv ssglrepral vvdvqngyly wtdwdhsli grigmdgssr  
 svivdtkitw pngltldyvt eriywadare dyiefasldg snrhvvlsqd iphifaltlf edyvywtdwe tksinrahkt  
 tgtntklis tlhrpmdlhv fhrlrqpdpv nhpckvnnng csnlcllspg gghkcacptn fylgsdgrtc vsnctasqfv  
 ckndkcpfw wkcdteddeg dhsdeppdep efkcrpgqfq cstgictnpa fiedgdndc q dnsdeanedi  
 hvclpsqfkc tntnrcipgi frengqdcg dgederdepe vtcapnqfqc sitkreiprv wvcdrdndcv  
 dgsdepanct qmtcgvdefr ckdsgrcipa rwkcdgeddc gdgsdepkee cdertcepyq frcknnrcvp  
 grwqcdydnd egdndsdeese tprpesesef scangrciag rwkcdgdhdc adgsdekdet predmdqfqc  
 ksghciplr wcdadadcmd gsdeeacgtg vrtcpldefq cmtlckpla wkcdgeddcg dnsdenpeec  
 arfvcpnnp frckndrvcl wigrqcdgtd negdgtdeed cepptahtth ckdkkefler nqrclsslr  
 cnmfddcgdg sdeedcsidp kltscatnas icgdearevr tekaaycacr sgfhtvpgqp gcqdineclr  
 fgtesqlenn tkgghelesca rnfmkthntc kaegseyqvl yiaddneirs lfpghphsay eqafqgdesv  
 ridamdvhvk agrvywtwh tgtsyrslp paapptsnr hrrqidrgvt hlnisglkmp rgiaidwvag  
 nvywtdsgrd vievaqmke nrktlisgmi dephaiivdp lrgtmywsdw gnphkietaa mdgtlretlv  
 qdniqwptgl avdyhnerly wadaksvig sirlngtdpi vaadskrgls hpfsidvfed yiygvtyinn rvfkikhkfg  
 splvntggl shasdvlyh qhkqpevtnp cdrkkcewlc llspsgpvc cpngkrldng tcvpvpstpt  
 ppdaprpqtc nlqcfnggsc flnarrqpkc rcqprytgdk celdqwehc rnggtcaasp sgmptercpt  
 gftgpkctqq vcagycanns tctvnqgnqp qrcrlpflg drcqyrqcsq ycenfgtcqm aadgsrqrc  
 tayfegsree vnkesrleg acvvnkqsgd vtncdgrv apseltevgh csnggsetmn skmmpecqcp  
 phmtgprcee hvfsqqqpg hiasilipll llllvlvagv vfwykrvqg akgfqhqrmt ngamnveign  
 ptykmyegge pddvgllida dfaldpdkpt nftnpyvatl ymgghgsrhs lastdekrel lgrgpedeig dpla

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

gcuggcggcggccgcccaggccggggccgcgcgcccagccugagccccgcccggccgagcgcugacaccgaaccugc  
 uugaaaugcagccgaggagccggggcggggcggcagcggcgggcgggcgggcgggggcagcggcaacccggcg  
 ccgcccgaaggacucggaggcugagacggcgggcgggcgggcgggggagcgcggggcgcgggcgggccggagcccc  
 ggcccgccauggccucccgagccgggcccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcugcugc  
 gcugcagcuccagcaucuucggcgggcagcggcugaucggcugcugcggcgccaaggccggccaaggauugcgaaa  
 aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcaucccucuguguggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac  
 cacagcagcagggagcagcugcccagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac  
 gaacgguggaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuuccgaugaguccgagggccacuugcaccaagcagg  
 uguguccugcagagaagcugagcuguggaccaccagccacaaguguguaccugccucguggcgcugcgcagggga  
 gaaggacugcggaggugggagcggauaggccggcgugcuaccuugugcggcccgacgaguuccagugcggcaac  
 cgcucugcggccggccguguucgugugcagggcgacgacgacuguggugacggcagcgaugagcgcggcugug  
 cagacccggccugcggggccccgcgaguuccgucggcgggcgauaggcgggcgccugcaucccgagcgcugggu  
 cugcggaccggcauuugacugcggaggaccgucggagcagggcagccgagcucugcggccguccggggccccggggcca  
 cguccgcggccggccugcggccaccggcucccaguuucgucggcgagcggcgagugcugcaccugggcugggcg





mglpepgplr llallllll llllqlqlhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcnerci psvwrededd dclhdhsdedd  
cpkktcadsd ftedngheih erwkedgeee cpdgsdesea tetkqvcpae klscgptshk cvpaswredg  
ekdceggade agcatlcaph efqcgnrsl aavfvcdgdd dcdgdsderg cadpacgpre frcggdggga  
ciperwvdr qfdcedrde aaelcgrpgp gatsapaaca tasqfacrsg ecvhlgwred gdrdckdksd  
eadeplgter gdefqcgdgt cvlaikhcnq eqdcpdgsde agclqglnecl hnnnggcshi ctdlkigfec tepagfqlld  
qktegdidec kdpdacsqic vnykgyfkce cypgyemdll tkneckaaagk spsliftnrh evrridlvkr  
nysrlipmlk nvvaldveva tnriywcldls yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwvkhk  
iywtdsgnkt isvatvdggr rrtlfsrnl epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksgl ngvdrqtlvs  
dniewpngit ldllsqrlw vsklhqlss idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrnlgl  
eisilaenln nphdivifhe lkqprapdac elsvqpnggc eylelpapqi sshspkytca cpdtmwlgpd  
mkrcyrapqs tsttlastm trtvpattra pgttvhrsty qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lspatsnhsq  
hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall emsgyliwrn wkrkntksmn fdnpvyrkt eeededelhi  
grtaqighvy paaissfdpr lwaepclget repedpapal kelfvlpgep rsqlhqlpkn plselpvvks krvalsledd  
glp

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

gcuggcggcgccgccagggccggggccgcccagccugagccccccccggcgccgagcgucaccgaaccugc  
uugaaaugcagccgagggagccggggcgggcggcagcggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcg  
ccgcggaaggacucggagggcugagacggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcg  
ggcccccaugggcccuccccagccggggcccucuccggcuucuggcgugcugcugcugcugcugcugcugcugcugc  
gucgagcuccagcaucuugcggcgggcagcggcugauccgucugcugcggcgccaagggccggccaaggauugcga  
aggaccaauuccagugcccgaacgagcgcugcaucccucuguguggagauccgagcaggacgagacugcuuagac  
cacagcagcagggacgacugccccaaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac  
gaacgguggaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuuccgagugcagggccacuugcaccagcagg  
uguguccugcagagaagcugagcuguggaccaccagccacaaguguguaccugccucguggcgugcagcggggga  
gaaggacugcgggggugggagcgggagggccggcugugcuaccuggcugaacgagugucgacaacaauaggcggc  
ugcucacacaucugcagaccucaagauuggcuuugaauccagugcccagcaggcuuccagcuccuggaccagaa  
gaccuguggcgacauugaugagugcaaggaccagauccugcagccagauccugugucauuuacaaggcuauuuu  
aagugugagugcuaccuggcuacgagauaggaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcuggcaagagcccauc  
ccuaaucuaccacaccggcagcagggugcgaggagcaccuggugaagcggaaacuauucacgccuaccuccaugc  
ucaagaauugcugggcacuagauuggaaguuccaccaauccgcaucucugggugugaccucuccuaccguaagauc  
uauagcgcuaauaggacaaggccagugaccgaaagagcaggaggucucuauugacgagcaguugcagcucuccaga  
gggcccuggcaguggacuggguccacaagcacaucucuggacugacucgggcauuuagaccuucaguggccacag  
uugaugggggccgcccagcagcucucucucagccguaacucagugaacccccgggccaucgcuugaccuccucgga  
ggguucauguauuggucugacuggggggaccaggccaagauugagaaaucugggcucaaccgguguggaccggcaaa  
cacuggugucagacaauuuuagauuggccaaccggaaucaccuggaucugcugagccagcgcuuuagucggguagac  
uccaagcuaccacacuguccagcauugacuucaguggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccug  
agccaccuuuuuggggaugcuguguuugaggacaaggugucuggacagaccugggagaacgaggccuuuuucagug  
caauucggcucauuggccuggaaaucccauccugcugagaaccuacaaccccacagucacuugucacuuccaug  
agcugaagcagccaagagcuccagaugccugugagcugaguguccagccuaauaggaggcugugaauaccugugccu  
uccugcuccucagauccagccacucucccaaguacacaugugccuguccugacacaauugggcuggguccagaca  
ugaagaggugcuaccgagcaccucaauucacucacgacguuagcuucacacagcagggacagauccagccaca  
ccacaagagccccgggaccaccguccacagaucaccuaccagaaccacagcacagagacaccaagccugacagcugc  
aguccaagcucaguauugucucccaggggcuccagcaucagcccugucuaaccuaagcccugcaaccagcaaccacuc  
ccagcacaugcaauagaagacagaaaguggcuaacagucacugccgcuuuuagggggaucagugcccuaug  
uggugauagcccuccugugcaugaguggauaccugaucuggagaaacuggaagcgggaagaacacccaaaagcaugaau

















nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvsrltssv hseqvfarl qdkklppls eiwdvhe

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

aggaaaggaggggugggccugaccccucggcagucuccuccucagccuuucccaauugcuacuucucuggggucucc  
 agguccugcuugugcucagcuccagcucacugggcugggcaccgagacuucuggacaggaaacugcaccuuccucuu  
 ucccagcaagggggcuccagagacugcccaccaggaagucuggugggccuggggauuuggacagugccuugguaau  
 gaccagggcuccaggaagagauuccuugggcugggggccccugugccugacauuccuccugacucugcggguga  
 gcuguggaagccagggcgcacaggaucaagcagccagggccagggaggcagcagcugcauccucagagaggaaagcca  
 ggauggccccacucugcugggggguacugcagggguggggucggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggc  
 agagccccuucagaaccacagagaucguccacaaaagcggaaaaaggggcccagccccaaaaugcuggggaacga  
 gcuauagcagcuguguggggacaaggccucgggcuuccacuacaauugucugagcugcggaggcugcaagggauc  
 uccgcccagcgcugcaucaagggagcgcacuacaucugccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcg  
 ucgcaagugccaggagugucggcuucgaaaugccgucagggcugggcugcgggaggaguguguccugucagaagaa  
 cagaucggcugaagaaacugaagcggcaagaggaggaacaggcucaugccacaucuuugccccaggggcuuccua  
 ccccccaauuccugccccagcucagcccggaaacaucgggcaugaucgagaagcucgucgucggccagcaacagugu  
 aaccggcgcuccuuucugaccggcuucgagucacggugaugcuucuggagacaucucggaggguacaaccucggga  
 gugagaguaucaccuuccucaaggauuucaguuuaaccgggaagacuugccaaagcagggcugcaaguggaauc  
 aucaaccuccuucgaguucuccagggccaugaauagagcugcaacucaaugaugccgaguuugccuugcucauugc  
 uaucagcaucuuucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauauggg  
 aagcccugcaugccuacgucuccauccaccuucccaugaccgacugauguuccacggaugcuauugaaacugguga  
 gccuccggaccucagcagcuguccacucagagcaaguguuugcacugcgcugcaggacaaaaagcuccaccgcug  
 cucucugagauucgggagugcagcaaugacuguuucugucccauauuuucuguuucuuuggccggauggcugag  
 gccuggugggcugccuccuagaaguggaacagacugagaagggcaaacauuccugggagcugggcaaggagaucucc  
 cguggcauuaaaagagagucaaaaggguuugcaguuuugggcuacugagcaguggagcccucgcuaacacugugcu  
 gugucugaagaucugcugaccccacaaacggauggccuugggggccacuugcagggguucuccagagcccugcc  
 cauccugccuccaccacuuccuguuuuuccacagggcccccaagaaaauuccacugucaaaaaaaaa

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

mslwlgapvp dipdsavel wkpgaqdass qaqqgsscil reearmpha ggtagvglea aeptalltra  
 eppsepteir pqkrkkpap kmlgnelecv egdkasgfhy nvlscgckg ffrrsvikga hyichsgghe  
 pmdtymrrkc qeclrkcrq agmreecvls eeqirllklk rqeeeqahat slpprasspp qilpqlspeq  
 lgmieklvaa qqcnrrsfs drlrvtml l etsrrynpgs esitflkdfs ynredfakag lqvefinpif efsramnelq  
 lndaefalli aisifsadrp nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvsrltssv hseqvfarl  
 qdkklppls eiwdvhe

5

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

aucuuacuaggaccugcuggggugcggggaaaaggcgcagucucggugggauugcugcaggaggucguggu  
 cuggcugugggcggaggagcauaagaagacucugcggugggagcuguggaagccaggcgcacaggauagcaagcagcca  
 ggcccaggggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggauagccccacucugcugggggguacugcaggggug  
 gggcugggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggcagagcccccucagaaccacagagaucguccacaa  
 aagcggaaaaaggggcccagccccaaaaugcuggggaacgagcuaugcagcuguguggggacaaggccucgggcuu  
 ccacuacaauugucugagcugcggaggcugcaagggauucuccgcccagcgcugcaucaagggagcgcacuacauc  
 gccacaguggcggccacugccccauggacaccuacaugcgcugcaagugccaggagugcggcuucgaaaugccgu  
 caggcugggcaugcgggaggaguguguccugucagaagaacagauccgccugaagaaacugaagcggcaagaggagga  
 acaggcucaugccacauccuugccccaggggcuuccuaccccccaauuccugccccagcucagcccggaaacaac  
 gggcaugaucgagaagcucgucgucgcccagcaacaguguaaccggcgcuccuuucugaccggcuucgagucacgc  
 cuuggcccagggcaccagaucucccauagccgggaggcccgucagcagcgcuuugcccacuuacugagcuggccauc

gucucugucaggagauaguugacuugcuaaacagcuacccggcuuccugcagcucagccgggaggaccagauug  
 ccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacaucucggagguacaaccucgggagugagaguau  
 caccuuccucaaggauuucaguuuaaacgggaagacuugccaaaagcagggcugcaaguggaaucucaacccca  
 ucuucgaguucuccagggccaugaaugcugcaacucaaugccgaguuugccuugcucuaugcuaucagcau  
 cuucucugcagaccggccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauauguggaagcccugc  
 augccuacgucuccauccaccaucccaugaccgacugauguuccacggaugcuaaugaaacuggugagccuccgg  
 acccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcucugcugcagggacaaaaagcuccaccggcugcucucuga  
 gaucugggagugcagcaaugacuguucugucccauauuuucuguuuucuuuggccggauggcugaggccuggug  
 gcugccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaaacauuccugggagcugggcaaggagauccucccguggcau  
 uaaaagagagucaaaagggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagccucgcuaacacugugcugugucuga  
 agaucaugcugaccccacaaacggauggggccugggggccacuugcacagggguucuccagagcccugcccauccugc  
 cuccaccacuuccuguuuuuccacagggcccaagaaaaauuccacugucaaaaaaaaa

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

mphsaggtag vgleaaepta lltraeppse pteirpqrkr kgpapkmIgn elesvcgdka sgfhynvlsc  
 egckgffrrs vlgahyich sghcpmdty mrrkcqecrl rkcrqagmre ecvlseeqir lklkrqee  
 qahatslppr assppqilpq lspeqlgmie klvaaqqqn rrsfdrdrv tpwpmaphdph srearrqrfh hftelaiivsv  
 qeivdfakql pgflqlsred qiallksai evmlletsrr ynpgsesitf lkdfsynred fakaglqvef inpifefsra  
 mnelqlndae falliaisif sadrpnvqdq lqverlqhty vealhayvsi hhphdrImfp rmlmklvslr tlssvhseqv  
 falrlqdkkl ppllseiwdv he

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

gauucuaacuuagcuaagcaaugcuacuggagaccuaggcaagccaagguacagcuucaggggaagucuuugguga  
 gcccacucucuuaccaagguaacgaagcgcagacuccggggccggguggggcggaucaccaccagguucacgccg  
 agaaggagcuggaggagagccgcccggcuccagccggaccgcuugcccgccaucaccguuguaaaucaugcagcaaa  
 caagcuggaacccgcugggugggcaccugcaagcagccgcccggacgcacccacucugcgguggagcuguggaagcca  
 ggcgcacaggaucaagcagccaggcccaggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggauggcccacuc  
 ugcuuggggguacugcaggggugggggcuggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggcagagcccccua  
 gaaccacagagauccguccacaaaagcggaaaaaggggccagcccccaaaugcugggggaacgagcuaugcagcug  
 ugugggggacaaggccucgggcuuccacuacaauuuucugagcugcaggggcucaagggauuuuccgcccagcgc  
 ucaucaagggagcgcacuacaucugccacagugggcgccacugccccauaggacaccuacaugcugcgaagugccag  
 gagugucggcuucgaaaugccgucagggcuggcaugcgggaggaguguguccugucagaagaacagauccgcccuga  
 agaaacugaagcggcaagaggaggaacaggcucaugccacauccuugccccagggcuuccuaccccccaaauc  
 ugcccagcucagcccggaaacaucugggcaugaucgagaagcucgucgucgcccagcaacaguguaaccggcgcucc  
 uuuucugaccggcuucgagucacgcuuuggcccauggcaccagaucucccauagccgggaggcccugcagcagcgcuu  
 ugcccacuuacugagcugggcaucgucucugugcagggagauaguugacuugcuaaacagcuacccggcuuccugc  
 agcucagcccgggaggaccagauugcccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacaucucggag  
 guacaaccucgggagugagagauaccuuccucaaggauuucaguuuaaacgggaagacuugccaaagcagggc  
 ugcaaguggaaucucaaccccacuuucgaguucuccagggccaugaugagcugcaacucaaugaugccgaguuu  
 gccuugcuaauugcuaucagcaucuuucugcagaccggcccacugcagggaccagcuccagguagagaggcugca  
 gcacacauauguggaagcccugcaugccuacgucuccauccaccaucccaugaccgacugauguuccacggaugc  
 aaugaaacuggugagccuccggaccucgagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcugcagggacaaaa  
 agcuccaccgcugcucucugagauccugggagugcagcaagagacuguuucugucccauauuuucuguuuucuuugg  
 ccggauggcugagggccuggguggcuccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaaacauuccugggagcuggg  
 caaggagauccucccguggcauuuuuuagagagucuuuuuuugggcuacugagcaguggagcccuc  
 gcuaaacacugugcugugucugaagaucugaccccacaaacggauggggccacuugcacaggguu





CGGGAAUGCCGCGGGCGGGGACGGCGAUUGGUCCGUAUGUGUGGUGCCACCG  
GCCGCCGGCUCCGCCCGGGCCCCCGCCCC

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

UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU  
AGAUAACUAAAUCGACAACAAAUCACAGUCUGCCAU AUGGCACAGGCCAUG  
CCUCUACAG

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

5 CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCAUCUGGAAGACUAGUGAUUUUGU  
UGUUGUCUUACUGCGCUCAACAACAAAUCCAGUCUACC UAAUGGUGCCAG  
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

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

GATCCGCCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAGTCT  
GA  
ACACTGGGTTTTTTGAATT

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

GATCCGCGGCGGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC  
CCGCCGTTTTTTGAATT

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

15 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 descripción 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 descripción también engloba varios kits adecuados para llevar a cabo los métodos mencionados anteriormente.

25 **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 descripción 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 descripción también incluye una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido apoEpl.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 hidroclouros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoilo, 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-hidroxi prolina puede sustituirse con prolina; la 5-hidroxisina 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 descripción 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.

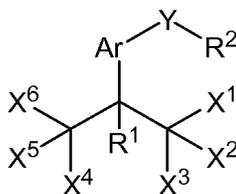
El término "elongación" se refiere a cualquier péptido objeto que tiene una secuencia de aminoácidos más larga por uno o más aminoácidos (bien en el extremo carboxi o amino terminal) que la de un péptido de la presente descripción. Preferiblemente, la elongación se produce en el extremo amino terminal. 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 descripción 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<sup>1</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

-OH, -CO<sub>2</sub>H, -O-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), -OC(O)-, -alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), -O-heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), -OC(O)-heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), -NH<sub>2</sub>, -NHalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>))<sub>2</sub> y -NH-S(O)<sub>2</sub>alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>);

5 R<sup>2</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), arilo y arilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>);

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

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

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

-N(R<sup>12</sup>)S(O)<sub>m</sub>-, -N(R<sup>12</sup>)S(O)<sub>m</sub>N(R<sup>13</sup>)-, -N(R<sup>12</sup>)C(O)-, -N(R<sup>12</sup>)C(O)N(R<sup>13</sup>)-, -N(R<sup>12</sup>)C(S)- y -N(R<sup>12</sup>)C(O)O-;

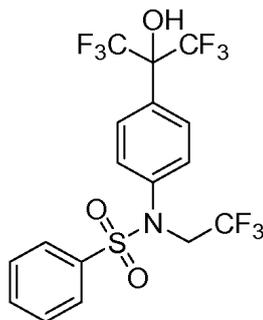
en donde R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en:

H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), arilo y arilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), y opcionalmente cuando Y es -N(R<sup>12</sup>)S(O)<sub>m</sub>- o -N(R<sup>12</sup>)S(O)<sub>m</sub>N(R<sup>13</sup>)-, R<sup>12</sup> forma un anillo de cinco o seis miembros fusionado a Ar o a R<sup>2</sup> a través de la unión covalente a Ar o a R<sup>2</sup>, respectivamente; y el subíndice m es un número entero de 1 a 2;

15 con la condición de que cuando R<sup>1</sup> es OH, e -Y-R<sup>2</sup> es -N(R<sup>12</sup>)S(O)<sub>m</sub>-R<sup>2</sup> o -N(R<sup>12</sup>)C(O)N(R<sup>13</sup>)-R<sup>2</sup> y está unido a una posición para respecto al carbono cuaternario unido a Ar, y cuando R<sup>2</sup> es fenilo, bencilo, o benzoilo, entonces i) al menos uno de R<sup>12</sup> o R<sup>13</sup> es distinto de hidrógeno y contiene un sustituyente aceptor de electrones, o ii) R<sup>2</sup> está sustituido con un resto distinto de amino, acetamido, dialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)amino, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>)amino, halógeno, hidroxilo, nitro, o alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>), o iii) la parte de anillo benceno de R<sup>2</sup> 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<sup>12</sup>)S(O)<sub>2</sub>- y R<sup>1</sup> es OH.

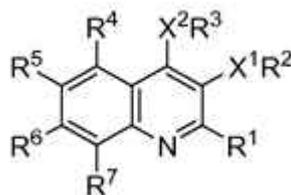
De acuerdo con esto, los compuestos de Fórmula I incluyen, pero no están limitados a, el compuesto con la estructura mostrada a continuación:



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

30

en donde:

R<sup>1</sup> es -H;

X<sup>1</sup> es un enlace, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, -C(O)-, -C(=CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)-, -O-, -S(O)<sub>t</sub>-, -NR<sup>8</sup>-, -CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>-, -CHR<sup>23</sup>, -CR<sup>8</sup>(CR<sup>9</sup>)<sub>2</sub>-, -C(CR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-,

-CR<sub>8</sub>(OC(O)R<sup>9</sup>)-, -C=NOR<sup>9</sup>-, -C(O)NR<sup>8</sup>-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>8</sup>-, -OCH<sub>2</sub>-, -SCH<sub>2</sub>-, -NR<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>-. o



- 5 R<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, arilalquilo C<sub>7</sub> a C<sub>11</sub>, fenilo, naftilo, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, CN, C(O)NH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup> o fenilo sustituido independientemente con uno o más de los grupos seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, halógeno, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>, -CN, -OH, y alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 5 flúor, o R<sup>2</sup> 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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, halógeno, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>, -CN, y alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 5 flúor;

X<sup>2</sup> es un enlace o -CH<sub>2</sub>-;

- 15 R<sup>3</sup> es fenilo, naftilo, o fenilo o naftilo sustituido independientemente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, hidroxilo, fenilo, acilo, halógeno, -NH<sub>2</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 5 flúor, NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -C(O)R<sup>10</sup>, -C(O)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>A, -C≡CR<sup>8</sup>, -CH=CHR<sup>8</sup>, -WA, -C≡CA, -CH=CHA, -WYA, -WYNR<sup>11</sup>-A, -WYR<sup>10</sup>, -WY(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -WCHR<sup>11</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>R<sup>10</sup>, -CHR<sup>11</sup>W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>R<sup>10</sup>, -CHR<sup>11</sup>W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -CHR<sup>11</sup>NR<sup>12</sup>YA, -CHR<sup>11</sup>NR<sup>12</sup>YR<sup>10</sup>, pirrol, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>)A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>WA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -CH=CHA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, y -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>Z, o R<sup>3</sup> 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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, hidroxilo, fenilo, acilo, halógeno, -NH<sub>2</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 5 flúor, -C(O)R<sup>10</sup>, -C(O)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>A, -C≡CR<sup>8</sup>, -CH=CHR<sup>8</sup>, -WA, -C≡CA, -CH=CHA, -WYA, -WYR<sup>10</sup>, -WY(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>R<sup>10</sup>, -CHR<sup>11</sup>W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>R<sup>10</sup>, -CHR<sup>11</sup>W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -CHR<sup>11</sup>NR<sup>12</sup>YA, -CHR<sup>11</sup>NR<sup>12</sup>YR<sup>10</sup>, -WCHR<sup>11</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>)A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>WA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -CH=CHA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, y -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>Z;

W es un enlace, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sup>11</sup>-, o -N(COR<sup>12</sup>)<sub>2</sub>;

Y es -CO-, -S(O)<sub>2</sub>-, -CONR<sup>13</sup>-, -CONR<sup>13</sup>CO-, -CONR<sup>13</sup>SO<sub>2</sub>-, -C(NCN)-, -CSNR<sup>13</sup>-, -C(NH)NR<sup>13</sup>-, o -C(O)O-;

j es 0 a 3;

- 30 k es 0 a 3;

t es 0 a 2;

D es un enlace, -CH=CH-, -C≡C-, -C=C-, -C(O)-, fenilo, -O-, -NH-, -S-, -CHR<sup>14</sup>-, -CR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>-, -OCHR<sup>14</sup>-, -OCR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>-, o -CH(OH)CH(OH)-;

p es 0 a 3;

- 35 Z es -CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>-, -CONR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>-, -C(NR<sup>10</sup>)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>-, -CONH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-, -CN, -CH<sub>2</sub>OH, -NR<sup>16</sup>R<sup>17</sup>-, fenilo, CONHCH(R<sup>20</sup>)COR<sup>12</sup>-, ftalamida, pirrolidina-2,5-diona, tiazolidina-2,4-diona, tetrazolilo, pirrol, indol, oxazol, 2-tioxo-1,3-tiazolinin-4-ona, aminas C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub>, aminas cíclicas C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> 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<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-, -CO<sub>2</sub>H-, -COCH<sub>3</sub>-, -CONH<sub>2</sub>-, y -CN;

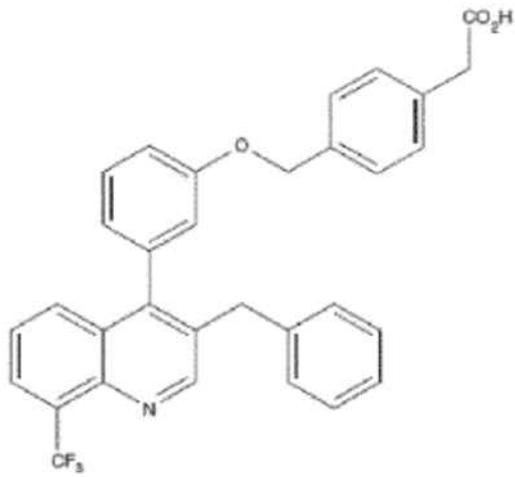
- 40 en donde dichas aminas C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> están sustituidas opcionalmente con uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, halógeno, -OCH<sub>3</sub>-, y -C≡CH;

en donde dicho fenilo está sustituido opcionalmente con CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>-, y en donde dichas aminas cíclicas C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> están sustituidas opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, -CH<sub>2</sub>OH, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-, y -CONH<sub>2</sub>-, y en donde dicho oxazol está sustituido opcionalmente con CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>;

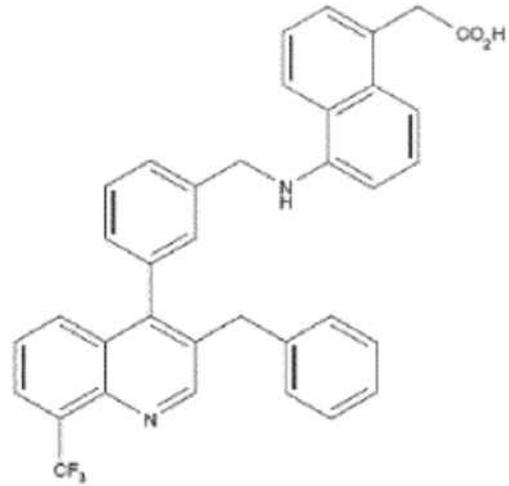
- 50 A es fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indano o bifenilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>, acilo, hidroxilo, halógeno, -CN, -NO<sub>2</sub>-, -CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>-, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>-, fenilo, perfluoroalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>-, -NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>-, -SR<sup>11</sup>-, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido con 1 a 5 flúor, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 2 grupos -OH, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor, o fenoxi sustituido opcionalmente con 1 a 2 grupos CF<sub>3</sub>; 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 hidrobenczo[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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, acilo, hidroxilo, -CN, -NO<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, -NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, -CH<sub>2</sub>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, -SR<sup>11</sup>, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido con 1 a 5 flúor, y alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor;
- 5 R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>6</sup> son cada uno, independientemente, -H o -F;
- R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, halógeno, -NO<sub>2</sub>, -CN, fenilo o fenilo sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> y OH;
- 10 con la condición de que si X<sub>1</sub>R<sup>2</sup> forma hidrógeno, entonces R<sup>3</sup> se selecciona de:
- (a) fenilo sustituido con -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>)A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>WA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -CH=CHA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, o -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, en donde el resto fenilo está además sustituido opcionalmente con uno o dos grupos seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>, halógeno, y CN; y
- 15 (b) un heterociclo seleccionado de pirimidina, tiofeno, y furano, cada uno de los cuales está sustituido con uno de -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -W(CR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>)A(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>WA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -CH=CHA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, -C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z, o -W(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>C≡CA(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>D(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Z;
- cada R<sup>8</sup> es independientemente -H, o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>;
- cada R<sup>9</sup> es independientemente -H, o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>;
- 20 cada R<sup>10</sup> es independientemente -H, -CH, alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub>, alqueno C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, alquino C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2-metil-tetrahidro-furano, 2-metil-tetrahidro-pirano, 4-metil-piperidina, morfolina, pirrolidina, o fenilo sustituido opcionalmente con uno o dos grupos alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub> está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, tioalcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, y CN;
- 25 cada R<sup>11</sup> es independientemente -H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> o R<sup>22</sup>; o R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>, 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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, OH y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; 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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, OH y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;
- cada R<sup>12</sup> es independientemente -H, o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>;
- 30 cada R<sup>13</sup> es independientemente -H, o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>;
- cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>7</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub>, alquino C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub>, -CH, -F, arilalquilo C<sub>7</sub> a C<sub>14</sub>, donde dicho arilalquilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, perhaloalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, halógeno, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>11</sup>, fenilo y alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, o R<sup>12</sup> y R<sup>15</sup> junto con el átomo al que están unidos pueden formar un anillo saturado de 3 a 7 miembros;
- 35 cada R<sup>16</sup> y R<sup>17</sup> es, independientemente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, alquino C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, fenilo, bencilo o cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub>, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> está sustituido opcionalmente con un grupo OH, y en donde dicho bencilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>; o R<sup>16</sup> y R<sup>17</sup>, 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<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>, -OH, CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y -CONH<sub>2</sub>;
- 40 cada R<sup>18</sup> y R<sup>19</sup> es, independientemente, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub>;
- cada R<sup>20</sup> es independientemente H, fenilo, o la cadena lateral de un alfa aminoácido natural;
- cada R<sup>22</sup> es independientemente arilalquilo sustituido opcionalmente con CH<sub>2</sub>COOH; y
- cada R<sub>23</sub> es fenilo;
- 45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

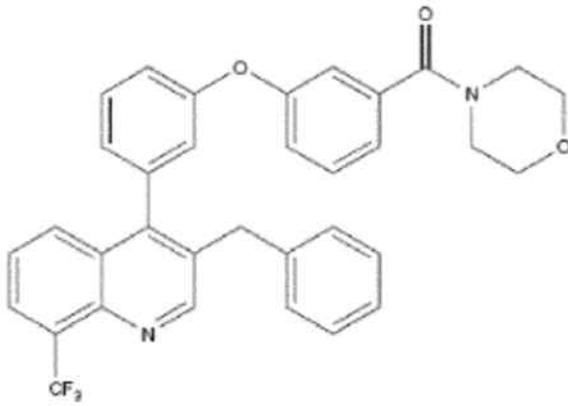
Los compuestos de Fórmula II pueden sintetizarse como se describe en la patente de EE.UU. No. 7.576.215. El compuesto de fórmula II puede ser cualquiera de los compuestos 26-32, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.



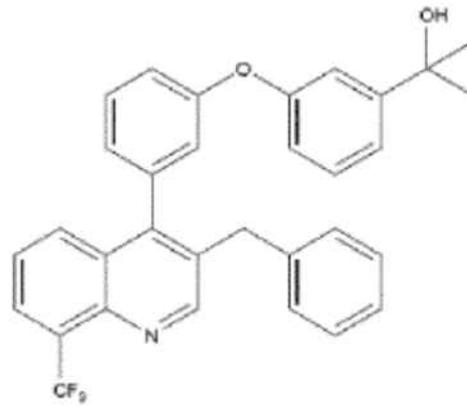
26



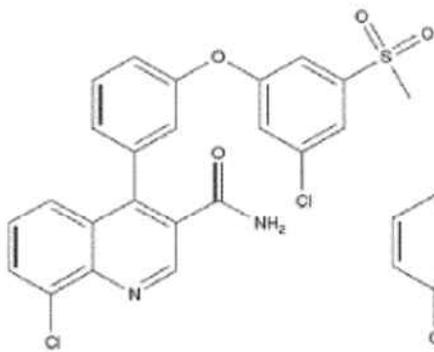
27



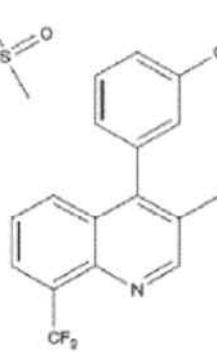
28



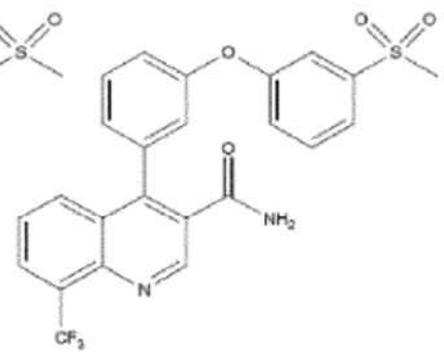
29



30

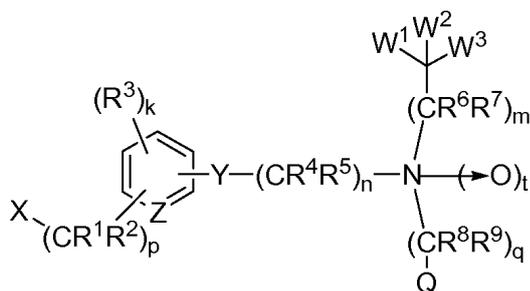


31



32

La Fórmula III se proporciona a continuación:



Fórmula III

en donde:

X se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, halo, -OR<sup>10</sup>, -NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, nitro, ciano, -COOR<sup>10</sup>, o -COR<sup>10</sup>.

5 Z es CH, CR<sup>3</sup> o N, en donde cuando Z es CH o CR<sup>3</sup>, 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<sup>12</sup>)-, y -C(R<sup>4</sup>)(R<sup>5</sup>)-;

10 W<sup>1</sup> se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, arilo y Het, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>3</sub>H, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

15 W<sup>2</sup> se selecciona de H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo, y en donde los restos cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, Ar y Het de dicho -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>3</sub>H, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

30 W<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en: H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

35 Q se selecciona de cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, Ar y Het; en donde dicho cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>3</sub>H, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

40 p es 0-8;

n es 2-8;

m es 0 o 1;

q es 0 o 1;

t es 0 o 1;

- 5 cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> 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<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;
- 10 cada R<sup>3</sup> es el mismo o diferente y se selecciona independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-C(O)SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-COR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OR<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>3</sub>H, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-SOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OCOR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-OC(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>15</sup>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>C(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NR<sup>13</sup>COR<sup>15</sup>, en donde dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;
- 15 cada R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se selecciona independientemente de H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>;
- R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>;
- R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>;
- 20 R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-O-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-O-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-O-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-S(O)<sub>x</sub>-alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-S(O)<sub>x</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-S(O)<sub>x</sub>-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-S(O)<sub>x</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-NH-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-NH-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-NH-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Het, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-Het y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, donde x es 0, 1, o 2, o R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>, 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<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, o alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> está sustituido opcionalmente con uno o más de los sustituyentes seleccionados independientemente del grupo halo, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -CONH<sub>2</sub>, -CONH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -CON(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido);
- 30 R<sup>12</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>;
- 35 cada R<sup>13</sup> y cada R<sup>14</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, o R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> 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;
- 40 y R<sup>15</sup> se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Ar, -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Het y -alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>;
- 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<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son fenilo, W<sup>3</sup> es hidrógeno, q es 1, y R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son hidrógeno.
- 45 En otras realizaciones, X es hidrógeno, p es 0, t es 0, Z es CH, e Y es -O-, W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son fenilo, W<sup>3</sup> es hidrógeno, q es 1, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> 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:



- 5 NR<sup>110</sup>COOR<sup>110</sup>, -C(=N-OH)R<sup>110</sup>, -C(=S)N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -S(=O)N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -S(=O)O<sup>110</sup>, -N(R<sup>110</sup>)S(=O)<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, -C(=O)N(R<sup>110</sup>)N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=O)-R<sup>110</sup>, -OC(=O)-OR<sup>110</sup> o N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, en donde cada R<sup>A</sup> está sustituido opcionalmente con 1 a 4 grupos que son independientemente -halógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariloxi, alquilo C<sub>0-6</sub>SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>COOR<sup>110</sup>, alcoxi C<sub>1-6</sub> arilo, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, -OR<sup>110</sup>, -SR<sup>110</sup>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, -COR<sup>110</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>110</sup>COOR<sup>110</sup>, -C≡N, -C(O)OR<sup>110</sup>, -CON(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -CON(R<sup>110</sup>)OR<sup>110</sup>, -OCON(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>110</sup>COOR<sup>110</sup>, -NR<sup>110</sup>CON(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>110</sup>COOR<sup>110</sup>, o -N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>;
- 10 R<sup>N</sup> es -L<sup>31</sup>-R<sup>60</sup>, en donde L<sup>31</sup> es un enlace, -X<sup>3</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sup>3</sup>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-X<sup>3</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1+w</sub>-, -Y<sup>3</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-, en donde cada w es independientemente 0-5: y cada X<sup>3</sup> es independientemente un enlace, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)=C(R<sup>110</sup>)-, -C≡C-, -CO-, -CS-, -CONR<sup>100</sup>-, -C(=N)(R<sup>100</sup>)-, -C(=N-OR<sup>110</sup>)-, -C[=N-N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>], -CO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>-, o -SO<sub>2</sub>N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>;- e
- 15 Y<sup>3</sup> es -O-, -S-, -NR<sup>70</sup>-, -N(R<sup>100</sup>)CO-, -N(R<sup>110</sup>)CO<sub>2</sub>-, -OCO-, -OC(=O)N(R<sup>100</sup>)-, -NR<sup>100</sup>CONR<sup>100</sup>-, -N(R<sup>110</sup>)SO<sub>2</sub>-, o -NR<sup>100</sup>CSNR<sup>100</sup>-;
- o L<sup>31</sup> es una cadena alidilo C<sub>2-6</sub> en donde la cadena alidilo está interrumpida opcionalmente por -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)=C(R<sup>110</sup>)-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>O-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>NR<sup>110</sup>-, -C≡C-, -O-, -S-, -N(R<sup>100</sup>)CO-, -N(R<sup>100</sup>)CO<sub>2</sub>-, -CON(R<sup>100</sup>)-, -CO-, -CO<sub>2</sub>-, -OC(=O)-, -OC(=O)N(R<sup>110</sup>)-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>100</sup>)SO<sub>2</sub>-, o -SO<sub>2</sub>N(R<sup>100</sup>)<sub>2</sub>;- y
- R<sup>60</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo, heterociclilo, -CN, -C(=O)R<sup>110</sup>, -C(=O)OR<sup>110</sup>, -C(=O)N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, -S(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)N(R<sup>110</sup>)N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, o -C(=O)N(R<sup>110</sup>)(OR<sup>110</sup>), en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo, o heterociclilo está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R<sup>60a</sup>, en donde
- 20 cada R<sup>60a</sup> es independientemente -Z, -Y<sup>1</sup>-Z, o -X-Y-Z;
- 20 cada R<sup>C</sup> es independientemente -L<sup>30</sup>-R<sup>70</sup>, en donde
- cada L<sup>30</sup> es independientemente un enlace o-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-V<sup>10</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en donde
- 25 V<sup>10</sup> es -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)=C(R<sup>110</sup>)-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>O-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>NR<sup>110</sup>-, -C≡C-, -O-, -S-, -NR<sup>10</sup>-, -N(R<sup>100</sup>)CO-, -N(R<sup>100</sup>)CO<sub>2</sub>-, -OCO-, -CO-, -CS-, -CONR<sup>100</sup>-, -C(=N-R<sup>110</sup>)-, -C(=N-OR<sup>110</sup>)-, -C[=N-N(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>], -CO<sub>2</sub>-, -OC(=O)-, -OC(=O)N(R<sup>100</sup>)-, SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>100</sup>)SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>100</sup>)-, -NR<sup>100</sup>CONR<sup>100</sup>-, -NR<sup>100</sup>CSNR<sup>100</sup>-, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, o ciclohaloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>; o cada L<sup>30</sup> es independientemente alidilo C<sub>2-6</sub>, en donde la cadena alidilo está interrumpida opcionalmente por -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>-, -C(R<sup>110</sup>)=C(R<sup>110</sup>)-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>O-, -C(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>NR<sup>110</sup>-, -C≡C-, -O-, -S-, -N(R<sup>100</sup>)CO-, -N(R<sup>100</sup>)CO<sub>2</sub>-, -NR<sup>110</sup>-, -CON(R<sup>100</sup>)-, -CO-, -CO<sub>2</sub>-, -O(C=O)-, -O(C=O)N(R<sup>100</sup>)-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sup>100</sup>)SO<sub>2</sub>-, o -SO<sub>2</sub>N(R<sup>100</sup>)<sub>2</sub>;-;
- 30 cada R<sup>70</sup> es independientemente hidrógeno, halógeno, nitro, arilo, heteroarilo, heterociclilo, -Z, -Y-Z, o -X-YZ,
- 30 en donde el arilo, heteroarilo, y heterociclilo, están cada uno sustituido opcionalmente con 1 a 4 R<sup>70a</sup> en donde cada R<sup>70a</sup> es independientemente ariloxi, aralquilo, ariloxialquilo, arilalquil C<sub>0-6</sub> carboxi, C(R<sup>110</sup>)=C(R<sup>110</sup>)COOH, oxo, -Z, -Y-Z, o -X-Y-Z, en donde cada R<sup>70a</sup> está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R<sup>80</sup>, y en donde cada R<sup>80</sup> es independientemente halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>(OR<sup>110</sup>), alquilo C<sub>0-6</sub>OR<sup>110</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>CON(R<sup>110</sup>)<sub>2</sub>, alquilo C<sub>0-6</sub>COR<sup>110</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>COOR<sup>110</sup>, o alquilo C<sub>0-6</sub>SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>;
- 35 cada R<sup>100</sup> es independientemente -R<sup>110</sup>, -C(=O)R<sup>110</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>, o -SO<sub>2</sub>R<sup>110</sup>;
- cada R<sup>110</sup> es independientemente -hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o -N(R<sup>12</sup>)<sub>2</sub>, en donde cualquier R<sup>110</sup> está sustituido opcionalmente con 1 a 4 radicales de R<sup>120</sup>;
- 40 cada R<sup>120</sup> es independientemente halógeno, ciano, nitro, oxo, -B(OR<sup>130</sup>), alquilo C<sub>0-6</sub>N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, (alquilo C<sub>0-6</sub>)C=O(OR<sup>130</sup>), alquilo C<sub>0-6</sub>OR<sup>130</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>COR<sup>130</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>SO<sub>2</sub>R<sup>130</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>CON(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, alquilo C<sub>0-6</sub>CONR<sup>130</sup>OR<sup>130</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>SO<sub>2</sub>N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, alquilo C<sub>0-6</sub>SR<sup>130</sup>, haloalquilo C<sub>0-6</sub>OR<sup>130</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>CN, - alquilo C<sub>0-6</sub>N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>130</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>130</sup>, u -Oalquilo C<sub>0-6</sub>COOR<sup>130</sup>;
- cada R<sup>130</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>;
- cada R<sup>140</sup> es independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>0-6</sub>CON(R<sup>110</sup>)<sub>o</sub>, alquilo C<sub>0-6</sub>CONR<sup>110</sup>R<sup>10</sup>, alquilo C<sub>0-6</sub>OR<sup>110</sup>, o alquilo C<sub>0-6</sub>COOR<sup>110</sup>; y
- 45 cada R<sup>150</sup> es independientemente hidrógeno, halógeno, OR<sup>130</sup>, alquilo(C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub>) o haloalquilo(C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub>), en donde
- 50 cada alquilo está sustituido opcionalmente con al menos un grupo que es cada uno independientemente halógeno, ciano, nitro, azido, OR<sup>130</sup>, C(O)R<sup>130</sup>, C(O)OR<sup>130</sup>C(O)N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, N(R<sup>130</sup>)C(O)R<sup>130</sup>, N(R<sup>130</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>130</sup>, -OC(O)OR<sup>130</sup>, OC(O)N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, N(R<sup>130</sup>)C(O)OR<sup>130</sup>, N(R<sup>130</sup>)C(O)N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>, SR<sup>130</sup>, S(O)R<sup>130</sup>, S(O)<sub>2</sub>R<sup>130</sup>, o S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>130</sup>)<sub>2</sub>; o dos R<sup>150</sup> (unidos al mismo átomo o a átomos diferentes) pueden tomarse conjuntamente para formar un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>;
- cada X es independientemente -O-, -S-, o -N(R<sup>100</sup>)<sub>2</sub>;

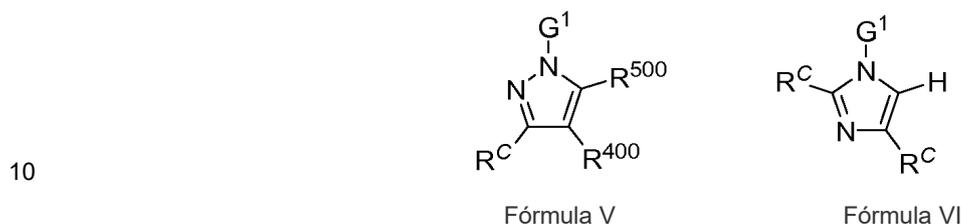
cada Y es independientemente  $-[C(R^{150})_2]_p-$ , o -alqueno  $C_2-C_6$ , en donde p es 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

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

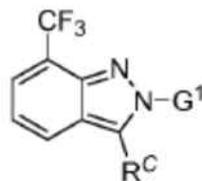
5 cada Z es independientemente -H, halógeno,  $-OR^{110}$ ,  $-SR^{110}$ ,  $-C(=O)R^{110}$ ,  $-C(=O)OR^{110}$ ,  $-C(=O)N(R^{110})_2$ ,  $-N(R^{100})_2$ ,  $-N_3$ ,  $-NO_2$ ,  $-C(=N-OH)R^{110}$ ,  $-C(=S)N(R^{110})_2$ ,  $-CN$ ,  $-S(=O)R^{110}$ ,  $-S(=O)N(R^{110})_2$ ,  $-S(=O)OR^{110}$ ,  $-S(=O)_2R^{110}$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

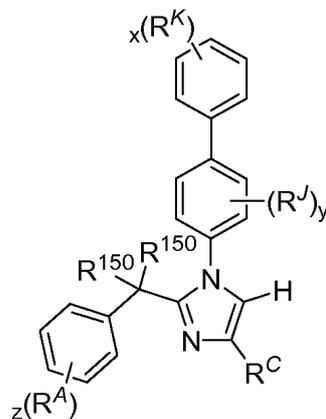


En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula VII:



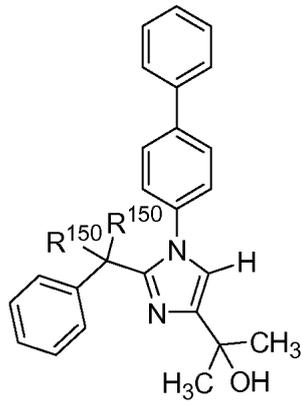
Fórmula VII

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



Fórmula VIII

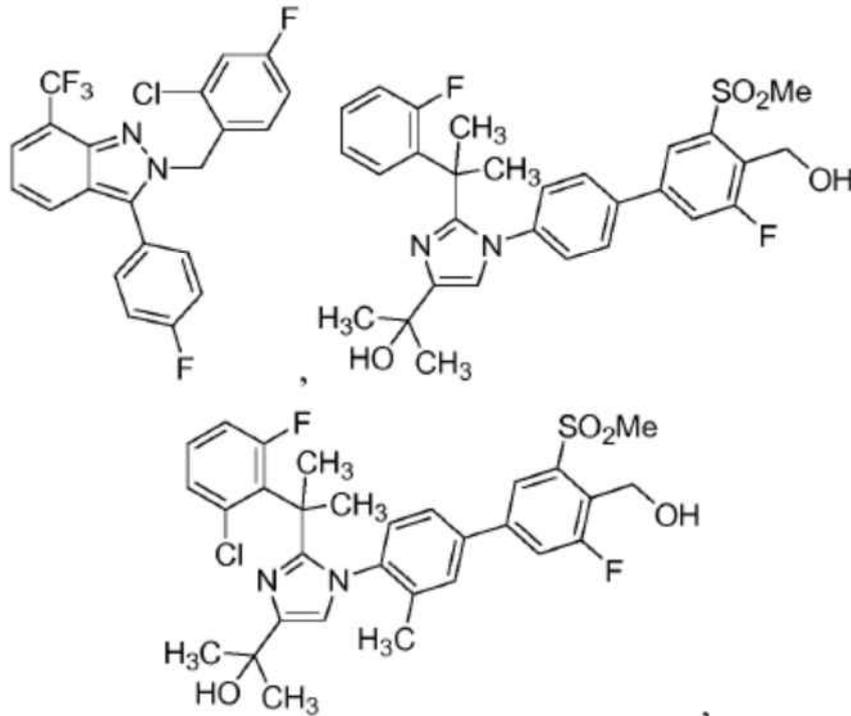
En más realizaciones adicionales, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula IX:



Fórmula IX

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

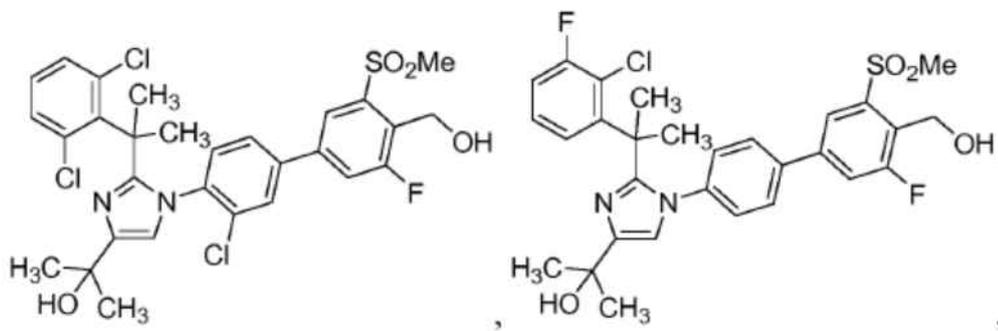
5



3

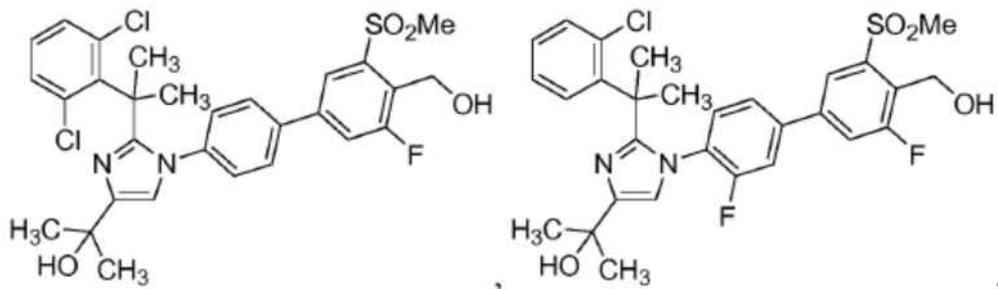
4

5



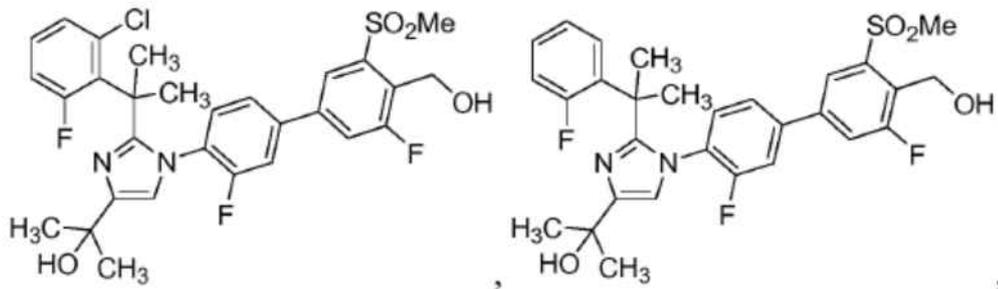
6

7



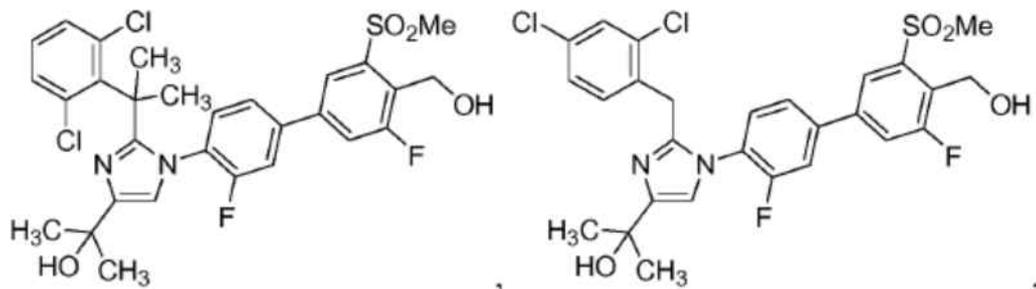
8

9



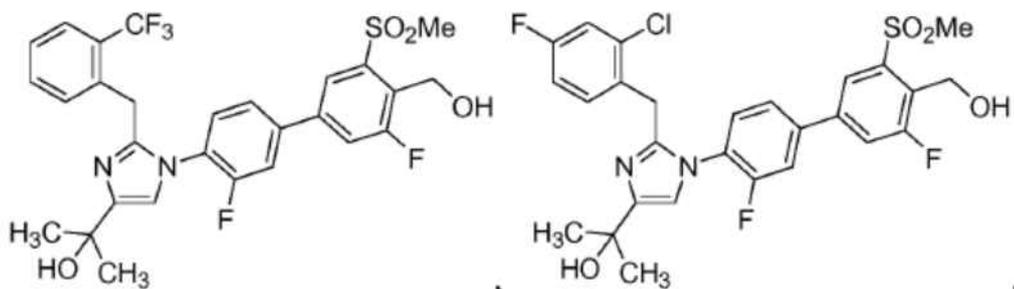
10

11

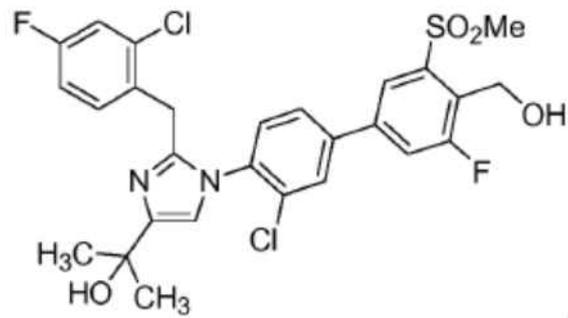


12

13

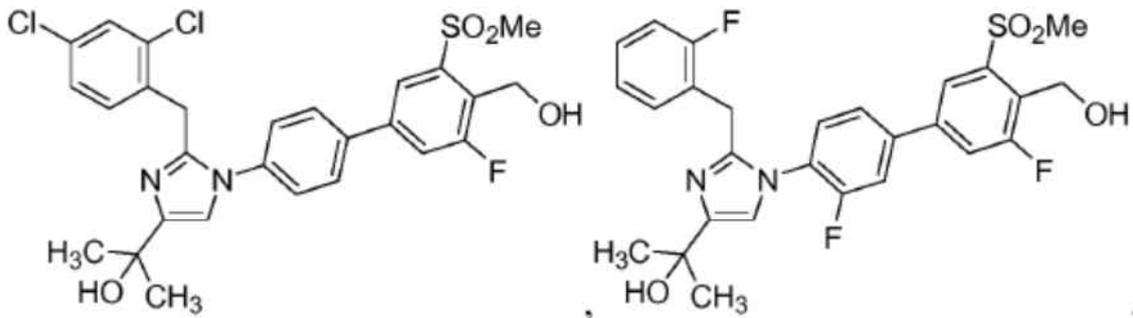


14



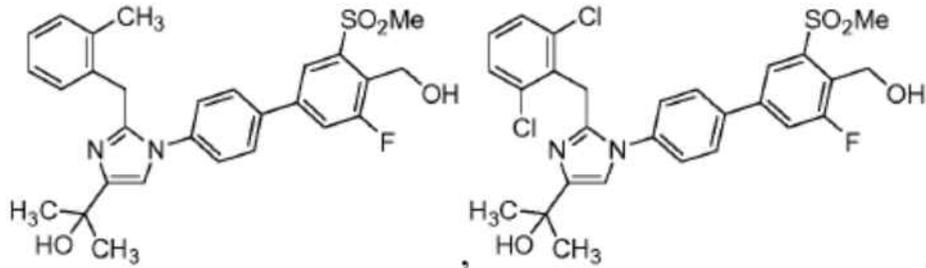
15

16



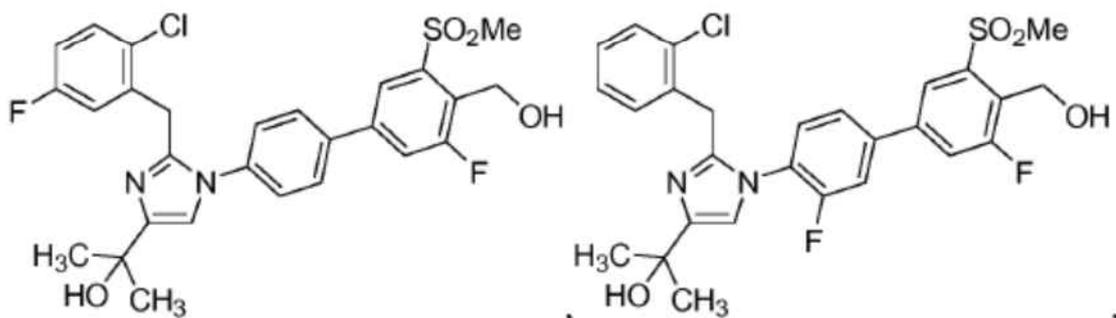
17

18



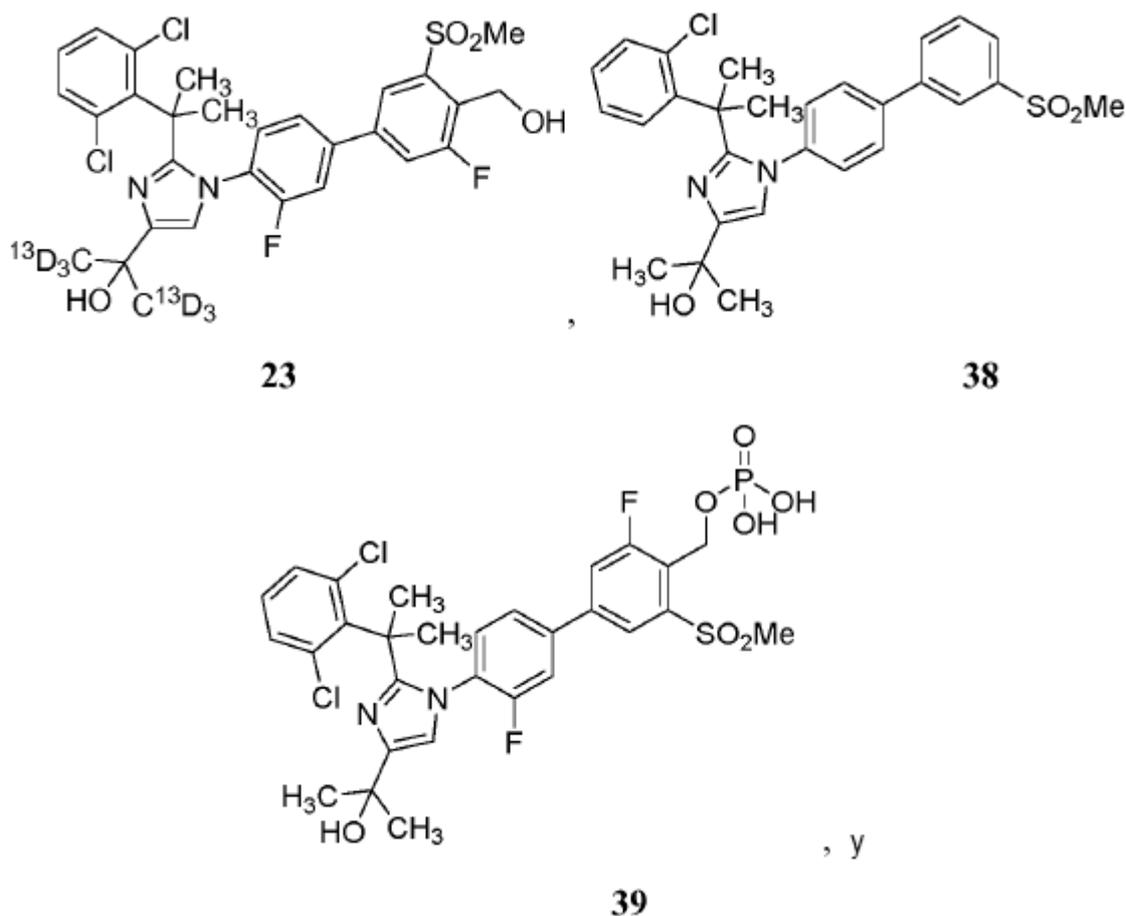
19

20



21

22

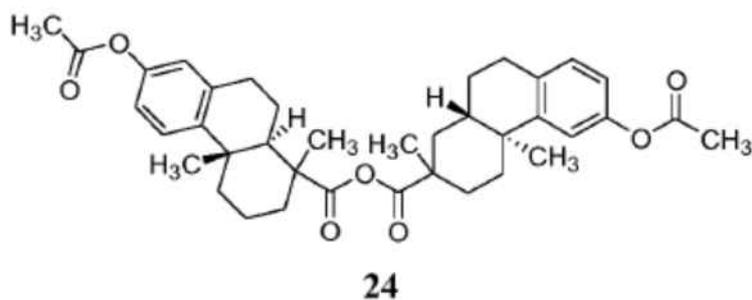


seleccionado de la lista que comprende:

- 5 **33** 2-(1-(3cloro-3'-fluoro-4'-(hidroximetil)-5'-(metilsulfonyl)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'-fluoro-4'-(hidroximetil)-5'(metilsulfonyl)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'(metilsulfonyl)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'(metilsulfonyl)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'(metilsulfonyl)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.
- 10

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

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.



- 15 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:

5 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.

10 *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*.

20 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<sub>50</sub> para compuestos seleccionados frente a *LXRα* y *LXRβ*

Compuesto	CE <sub>50</sub> – <i>LXRα</i> (nM)	CE <sub>50</sub> – <i>LXRβ</i> (nM)
GW3965 <b>2</b>	200	40
SB742881 <b>25</b>	74	25
TO901317 <b>1</b>	20	50
LXR-623 <b>3</b>	179	24
<b>12</b>	<100	11
<b>38</b>	101-1000	630

25 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 CE<sub>50</sub> 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 descripción 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<sub>50</sub>. Por ejemplo, GW3965 **2** tiene una actividad aproximadamente 6 veces mayor para *LXRβ* (CE<sub>50</sub>= 30) comparado con *LXRα* (CE<sub>50</sub>= 190).

35 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 2μM, 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 descripción.

40 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.

45 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.

5 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.

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

20 El término "alquenileno o alqueniilo", 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.

25 El término "alquinileno o alquiniilo", 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.

30 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.

35 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  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ , y  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . 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 polietileno glicol.

45 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.

50 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 descripción 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;

5 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, indolazino, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftpiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolona, isoxazolona, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidino, aziridinilo, 1,4-dioxanilo, hexahidroazepino, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidino, metilendioxi-benzoilo, 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<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)R<sub>x</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub> en donde cada aparición de R<sub>x</sub> 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.

45 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<sub>n</sub>F<sub>2n+1</sub>. 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.

50 El término "amino", tal y como se usa en la presente memoria, representa -N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>, en donde cada R<sup>N1</sup> es, independientemente, H, OH, NO<sub>2</sub>, N(R<sup>N2</sup>)<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>, SOR<sup>N2</sup>, un grupo protector de *N*, alquilo, alqueno, alquilino, alcoxi, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterociclilo (p. ej., heteroarilo), alquilheterociclilo (p. ej., alquilheteroarilo), o dos R<sup>N1</sup> se combinan para formar un heterociclilo o un grupo protector de *N*, y en donde cada R<sup>N2</sup> es, independientemente, H, alquilo, o arilo. En una realización preferida, amino es -NH<sub>2</sub>, o -NHR<sup>N1</sup>, en donde R<sup>N1</sup> es, independientemente, OH, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NR<sup>N2</sup>, SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>, SOR<sup>N2</sup>, alquilo, o arilo, y cada R<sup>N2</sup> 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<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR', CONR'<sub>2</sub>, OR', SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, o NR'SO<sub>2</sub>R', 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<sub>3</sub>), nitro (-NO<sub>2</sub>), 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<sub>2</sub>H), éster carboxílico (-CO<sub>2</sub>R'), carbamoilo (-OC(=O)NR'R" o -NRC(=O)OR'), hidroxilo (-OH), isociano (-NC), sulfonato (-S(=O)<sub>2</sub>OR), sulfonamida (-S(=O)<sub>2</sub>NRR' o -NRS(=O)<sub>2</sub>R'), o sulfonilo (-S(=O)<sub>2</sub>R), donde cada R o R' se selecciona, independientemente, de H, alquilo C1-C6 o heteroarilo, alquenilo C2-C6 o heteroalquenilo, alquinilo C2-C6 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, tetrahydroquinolilo, benzofurilo, benzotienilo y semejantes.

Algunos de los compuestos de la presente descripción 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 descripción 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 descripción son compuestos enantiopuros. En determinadas otras realizaciones, se proporcionan mezclas de estereoisómeros o diastereómeros. Además, cuando los compuestos de la descripción 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 descripción 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 descripción también engloba derivados farmacéuticamente aceptables de estos compuestos y composiciones que comprenden uno o más compuestos de la descripción 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 descripción 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 descripción 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 retrolentel 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 descripción. 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 descripción" 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 descripción 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 poli(acrilamida), o HPLC. Un polipéptido aislado descrito en la descripción 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  $\beta$  (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 descripción 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 descripción 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 descripción 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 epítipo 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 descripción. Alternativamente, el polipéptido de la descripción 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).

5 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 descripción 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 endocítica 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.

15 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 delección de una cadena lateral, y aquellos a los que se ha unido un compuesto tal como polietileno 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.

25 Para expresar los factores mencionados anteriormente, la descripción 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 procarionte o eucariote 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.

35 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).

45 La presente descripción 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 descripción, 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 procariontes y eucariotes también se describen en Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press).

55 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 descripción 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 maquinaria 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 descripción 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 maquinaria 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 maquinaria 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 incorporarse 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 descripción 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 descripción 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 policonjugados tales como polilisina que actúan como neutralizadores de carga del núcleo fosfato, o restos hidrofóbicos tales como lípidos (p. ej., fosfolípidos, colesterolos, 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 colesterolos o derivados de los mismos (p. ej., clorofornato 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 polietileno glicol, tetraetileno glicol y semejantes. La acción inhibitoria del ADN antisentido puede examinarse usando un sistema de expresión génica basado en una línea celular o un animal de la presente descripción *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 descripción 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.

5 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),  
10 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 descripción 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.

Quando 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 hipervariabilidad, 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 epítipo 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 descripción 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 descripción.

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 ingeniería 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 fluoroscopia.

"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 descripción 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 descripción 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 memoria, 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 descripción 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 coagulandos. 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 subcutáneamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, intrarrectalmente, intravaginalmente, intranasalmente, intragástricamente, intratraquealmente, o intrapulmonariamente.

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 descripción 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 descripción, 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 descripción 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 descripción 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 descripción, 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 descripción. 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 alginico; 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 descripción puede administrarse parenteralmente, oralmente, nasalmente, rectalmente, tópicamente, o bucalmente. 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 descripción 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.

5 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.

20 También se apreciará que los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente descripción 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).

30 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	Clorambucilo
	dacarbazina	procarbazona
	ifosfamida	altretamina
	hexametilmelamina	fosfato de estramustina
	tiotepa	mecloretamina
	dacarbazina	estreptozocina
	lomustina	temozolomida
	ciclofosfamida	Semustina
Agentes de platino	espiroplatino	lobaplatino (Aeterna)
	tetraplatino	satraplatino (Johnson Matthey)
	ormaplatino	BBR-3464 (Hoffmann-La Roche)
	iproplatino	SM-11355 (Sumitomo)
	ZD-0473 (AnorMED)	AP-5280 (Access)
	oxaliplatino	cisplatino
	carboplatino	

Tabla 2		
Antimetabolitos	azacitidina Floxuridina 2-clorodeoxiadenosina 6-mercaptopurina 6-tioguanina citarabina 2-fluorodesoxicidina 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

Tabla 2		
Agentes antimitóticos	colchicina	E7010 (Abbott)
	vinblastina	PG-TXL (Cell Therapeutics)
	vindesina	IDN 5109 (Bayer)
	dolastatina 10 (NCI)	A 105972 (Abbott)
	rizoxina (FujiSawa)	A 204197 (Abbott)
	mivobulina (Warner-Lambert)	LU 223651 (BASF)
	cemadotina (BASF)	D 24851 (ASTAMedica)
	RPR 109881A (Aventis)	ER-86526 (Eisai)
	TXD 258 (Aventis)	combretastatin A4 (BMS)
	epotilona B (Novartis)	isohomohalicondrina-B (PharmaMar)
	T 900607 (Tularik)	ZD 6126 (AstraZeneca)
	T 138067 (Tularik)	AZ10992 (Asahi)
	criptoficina 52 (Eli Lilly)	IDN-5109 (Indena)
	vinflunina (Fabre)	AVLB (Prescient NeuroPharma)
	auristatina PE (Teikoku Hormone)	azaepotilona B (BMS)
	BMS 247550 (BMS)	BNP-7787 (BioNumerik)
	BMS 184476 (BMS)	profármaco CA-4 (OXiGENE)
	BMS 188797 (BMS)	dolastatina-10 (NIH)
	taxoprexina (Protarga)	CA-4 (OXiGENE)
	SB 408075 (GlaxoSmithKline)	docetaxel
Vinorelbina	vincristina	
Tricostatina A	paclitaxel	
Inhibidores aromatasa de	aminoglutetimida	YM-511 (Yamanouchi)
	atamestano (BioMedicines)	formestano
	letrozol	exemestano
	anastrozol	
Inhibidores de timidilato sintasa	pemetrexed (Eli Lilly)	nolatrexed (Eximias)
	ZD-9331 (BTG)	CoFactor™ (BioKeys)

ES 2 765 573 T3

Tabla 2		
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) tripina (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)	alitreinoína (Ligand)

Tabla 2		
Inmunomoduladores	interferón	terapia de dexosoma (Anosys)
	oncofago (Antigenics)	pentrix (Australian Cancer Technology)
	GMK (Progenies)	ISF-154 (Tragen)
	vacuna de adenocarcinoma (Biomira)	vacuna de cáncer (Intercell)
	CTP-37 (AVI BioPharma)	norelina (Biostar)
	IRX-2 (Immuno-Rx)	BLP-25 (Biomira)
	PEP-005 (Peplin Biotech)	MGV (Progenies)
	vacunas de synchrovax (CTL Immuno)	β-aletina (Dovetail)
	vacuna de melanoma (CTL Immuno)	terapia de CLL (Vasogen)
	vacuna de p21 RAS (GemVax)	Ipilimumab (BMS),
	MAGE-A3 (GSK)	CM-10 (cCam Biotherapeutics)
	nivolumab (BMS)	MPDL3280A (Genentech)
	abatacept (BMS)	
Agentes hormonales y antihormonales	estrógenos	dexametasona
	estrógenos conjugados	prednisona
	etinil estradiol	metilprednisolona
	clortrianiseno	prednisolona
	idenestrol	aminoglutetimida
	caproato de hidroxiprogesterona	leuprólido
	medroxiprogesterona	octreótido
	testosterona	mitotano
	propionato de testosterona;	P-04 (Novogen)
	flouximesterona	2-metoxiestradiol (EntreMed)
	metiltestosterona	arxoxifeno (Eli Lilly)
	dietilestilbestrol	tamoxifeno
	megestrol	toremofina
	bicalutamida	goserelina
	flutamida	Leuporelina
	nilutamida	bicalutamida

Tabla 2		
Agentes fotodinámicos	talaporfina (Light Sciences)	Pd-bacteriofeoforbida (Yeda)
	Theralux (Theratechnologies)	texafirina de lutecio (Pharmacyclics)
	motexafina gadolinio (Pharmacyclics)	hipericina
Inhibidores de quinasa	imatinib (Novartis)	EKB-569 (Wyeth)
	leflunomida (Sugen/Pharmacia)	kahalido F (PharmaMar)
	ZD 1839 (AstraZeneca)	CEP-701 (Cephalon)
	erlotinib (Oncogene Science)	CEP-751 (Cephalon)
	canertinib (Pfizer)	MLN518 (Millenium)
	escualamina (Genaera)	PKC412 (Novartis)
	SU5416 (Pharmacia)	Fenoxodiol (Novogen)
	SU6668 (Pharmacia)	C225 (ImClone)
	ZD4190 (AstraZeneca)	rhu-Mab (Genentech)
	ZD6474 (AstraZeneca)	MDX-H210 (Medarex)
	vatalanib (Novartis)	2C4 (Genentech)
	PKI166 (Novartis)	MDX-447 (Medarex)
	GW2016 (GlaxoSmithKline)	ABX-EGF (Abgenix)
	EKB-509 (Wyeth)	IMC-1C11 (ImClone)
	trastuzumab (Genentech)	Tirfostinas
	OSI-774 (Tarceva™)	Gefitinib (Iressa)
	CI-1033 (Pfizer)	PTK787 (Novartis)
	SU11248 (Pharmacia)	EMD 72000 (Merck)
	RH3 (York Medical)	Emodina
	Genisteína	Radicinol
	Radicinol	Vemurafenib (inhibidor de la enzima B-Raf, Daiichi Sankyo)
	Met-MAb (Roche)	

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

Tabla 2
Bleomicina
Absintina
Ácido crisofánico
Óxidos de cesio
Inhibidores de BRAF
Inhibidores de PDL1
Inhibidores de MEK

**Métodos de diagnóstico y pronóstico**

5 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*

10 En un aspecto, la descripción 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 descripción 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 Los métodos de la presente descripción 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.

40 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 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 descripción 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 descripción 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 descripción, 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 descripción 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 de 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 descripción 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 descripción 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*

La presente descripción también 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 descripción 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.

5 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 descripción permiten la cuantificación de otros productos de la expresión génica, incluyendo ARNt, ARNr, o u otros productos de la transcripción.

10 Opcionalmente, los kits de la descripción 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.

15 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 descripción.

20 En un aspecto adicional, la presente descripción 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.

25 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.

35 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.

50 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 desoxirribosa 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 acelar 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 descripción 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** (Solo la materia abarcada por el alcance de las reivindicaciones forma parte de la invención).

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*

5 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*

10 Con el fin de identificar los miARN desregulados 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*

15 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*

20 Después de la inyección en la vena de la cola de  $4 \times 10^4$  células MeWo-LM2, los ratones NOD-SCID se trataron intravenosamente 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*

25 Para la visualización macroscópica gruesa de los nódulos metastásicos, se tiñeron con H y E secciones de tejido pulmonar con un grosor de 5  $\mu$ m. 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*

35 Todos los datos se representan como media  $\pm$  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*

40 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).  
45 Brevemente, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células parentales de melanoma pigmentadas MeWo o no pigmentadas A375 en 0,1 mL de PBS y se inyectaron intravenosamente 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  $2 \times 10^5$  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.

50 Con el fin de monitorizar las metástasis *in vivo* a través de imaginería 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 imagenología bioluminiscente no invasiva como se ha descrito previamente (Minn et al., 2005). Para determinar si la selección *in vivo* se había conseguido, se resuspendieron  $4 \times 10^4$  células parentales MeWo o células MeWo-LM2 y  $1 \times 10^5$  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  $4 \times 10^4$  células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, miR-214, o una horquilla control,  $4 \times 10^4$  células MeWo-LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control, y  $2 \times 10^5$  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 intravenosamente  $1 \times 10^5$  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  $100 \mu\text{g/mL}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Después de 24 horas, se inyectaron  $4 \times 10^4$  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 intravenosamente  $1 \times 10^5$  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 delección genética de ApoE en la metástasis, se inyectó intravenosamente a ratones C57BL/6-WT o C57BL/6-ApoE<sup>-/-</sup> de 8 semanas de edad  $5 \times 10^4$  células de melanoma de ratón B16F10. Para los estudios de crecimiento tumoral primario, se mezclaron  $1 \times 10^6$  células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control 1:1 con matrigel y se inyectaron subcutáneamente en el flanco inferior derecho de ratones NOD-SCID inmunodeficientes de 6 semanas de edad. Los animales se palpaban 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  $(\text{diámetro pequeño})^2 \times (\text{diámetro grande})/2$ .

#### *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  $6 \mu\text{g}$  de vector A,  $12 \mu\text{g}$  de vector K, y  $12 \mu\text{g}$  del miR-Zip apropiado (System Biosciences, Mountain View, CA) o construcción de plásmido ARNsh (MSKCC HTS Core Facility, Nueva York, NY) usando  $60 \mu\text{L}$  de reactivo de transfección TransIT-293 (MIR 2700, Minis Bio LLC, Madison, WI). Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas, y el virus se recogió por centrifugación del medio celular durante 10 minutos a  $2.000\text{g}$  seguido de la filtración del virus a través de un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Se transdujeron  $1 \times 10^5$  células cancerosas con 2 mL del virus apropiado en presencia de  $10 \mu\text{g/mL}$  de polibreno (TR-1003-G, Millipore, Billerica, MA) durante 6 hrs. Después de 48 horas, se añadieron  $2 \mu\text{g/mL}$  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:

40

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

GATCCGACAGTAGCCTGCACATTAGTCACTTCCTGTCAGTAACCAATG  
TGCAGACTACTGTTTTTTGAATT-3'

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

GATCCGCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAG  
TCTGAACACTGGGTTTTTTGAATT-3'

5 miR-Zip-1908 5'-

GATCCGCGGCGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC  
CC GCCGTTTTTTGAATT-3'

Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:

shAPOE<sup>1</sup>:

5'CCGGGAAGGAGTTGAAGGCCTACAACCTCGAGTTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

10 shAPOE<sup>2</sup>:

5'CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGC  
TTTTT3'

shDNAJA4<sup>1</sup>:

5'CCGGGCGAGAAGTTTAAACTCATATCTCGAGATATGAGTTTAAACTTCTCGC  
TTTTT3'

shDNAJA4<sup>2</sup>:

5'CCGGCCTCGACAGAAAGTGAGGATTCTCGAGAATCCTCACTTTCTGTCGAGG  
TTTTT3'

15

*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:

25

ApoE\_CDS\_Dir : 5'-TCATGAGGATCCATGAAGGTTCTGTGGGCT-3'

ApoE\_CDS\_Inv : 5'-TAGCAGAATTCTCAGTGATTGTGCTGGG-3'

DNAJA4\_CDS\_Dir : 5'-ATCCCTGGATCCATGTGGGAAAGCCTGACCC-3'

DNAJA4\_CDS\_Inv : 5'-TACCATGTCGACTCATGCCGTCTGGCACTGC-3'

*Inactivación de miARN basada en LNA*

5 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  $1 \times 10^5$  células intravenosamente 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 ARNs*

10 Se transfectaron ARNs 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 ARNs 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 ARNs control no dirigidos se obtuvieron de Dharmacon. Se usaron las siguientes secuencias diana de LRP1 y LRP8:

siLRP1<sup>1</sup>: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP1<sup>2</sup>: 5'-GCUAUGAGUUUAAGAAGUU-3';

siLRP8<sup>1</sup>: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP8<sup>2</sup>: 5'-GAACUAUUCACGCCUCAUC-3'.

#### *Ensayo de proliferación celular*

20 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  $2,5 \times 10^4$  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  $3 \times 10^4$  células de melanoma MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE (100  $\mu$ M) o BSA (100  $\mu$ M). Las células viables se contaron después de 8, 24, 48, 72, y 120 horas.

#### *Ensayo de invasión de matrigel*

25 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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ g/mL de anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa), 5-40  $\mu$ g/mL de anti-IgG (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN), ApoE3 humana recombinante 100  $\mu$ M (4696, Bio Vision, Mountain View, CA), y BSA 100  $\mu$ M (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*

45 Se sembraron  $5 \times 10^4$  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  $\mu$ m HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon, San José, CA) se puso en cada pocillo. Se sembraron  $1 \times 10^5$  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  $\mu$ g/mL de anti-ApoE 1D7, 40  $\mu$ g/mL de anti-IgG, rhApoE3

100  $\mu\text{M}$ , y BSA 100  $\mu\text{M}$ . 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*

5 Se pulsaron HUVEC privadas de suero con tinción Cell Tracker Red CMTPIX durante 45 minutos y se sembraron en insertos trans-well HTS Fluoroblock a una concentración de  $1 \times 10^5$  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*

10 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 CMTPIX durante 45 minutos. Mientras tanto, se mezclaron las cantidades indicadas (1-5  $\mu\text{g}$ ) de ApoE3 humana recombinante o BSA con 250  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{M}$  HTS Fluoroblock en cada pocillo. Se sembraron  $1 \times 10^5$  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*

20 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  $2 \times 10^5$  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*

30 Se sembraron  $1 \times 10^6$  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*

35 Para determinar los efectos de miR-199a y miR-1908 en la capacidad de privación de suero de células de melanoma, se sembraron  $1 \times 10^5$  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  $3 \times 10^4$  células MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE3 (100  $\mu\text{M}$ ) o BSA (100  $\mu\text{M}$ ) 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.

45 *Hibridación en micromatriz de miARN*

50 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*

5 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*

20 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*

30 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*

35 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<sup>4</sup> 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 siembra 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'-T TACTGCGGCCGCTGCGTGAAACTTGGTGAATCTT-3'  
 DNAJA4\_3'UTR\_Dir : 5'-TAATATCTCGAGCGTGGTGC GG GGCAGCGT-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'-

CAGCGGGAGACCCTGTCCCCATAACCAGCCGTCCTCCTGGGGTG-3'

APOE\_3'UTR\_mut2: 5'-

TCCCCGCCCCAGCCGTCCTCACAGGGTGGACCCTAGTTTAATA-3'

DNAJA4\_CDS\_mut1: 5'-

GGGATCGGTGGAGAAGTGCCTATTGTGCAAGGGGGCGGGGGATG-3'

DNAJA4\_CDS\_mut2: 5'-

GTAGGGGGCGGGGAACGTGTTATCCGTGAAGAGGTGGCTAGGG-3'

DNAJA4\_3'UTR\_mut1: 5'-

CAGGGCCAACCTTAGTTCCTAACATTCTGTGCCCTTCAGTGGAT-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  $\mu\text{m}^2$ . Para nódulos grandes, se obtuvo un mínimo de cuatro imágenes representativas, y se calculó su densidad promedio de vasos sanguíneos.

#### 15 *Ensayo de tapón de matrigel in vivo*

Se mezclaron 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ApoE3 humana recombinante (4696, Bio Vision), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BSA (A2153, Sigma Aldrich), o 400 ng/ml de VEGF con matrigel (356231, BD Biosciences) como se indica. Se inyectaron subcutáneamente 400  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$ . 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 (C1) fue un obsequio de Poulikos Poulidakos (Mount Sinai Medical School) y la línea celular de melanoma murino primario *B-Raf*<sup>V600E/+</sup>; *Pten*<sup>-/-</sup>; *CDKN2A*<sup>-/-</sup> fue proporcionada generosamente por Marcus Rosenberg (Yale University). Todas las demás líneas celulares usadas se adquirieron en ATCC.

#### 35 *Elisa de ApoE*

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

*Transferencia Western*

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, Abcam) y anti-tubulina  $\alpha/\beta$  (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 (ab1906, Abcam).

*Histoquímica*

Los animales se perfundieron intracardiamente 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 (ab15580, Abcam), 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 imaginería bioluminiscente. Se inyectaron intravenosamente a través de la vena de la cola los siguientes números de células de melanoma, resuspendidas en 100 µL de PBS: 4 x 10<sup>4</sup> células MeWo, 2,5 x 10<sup>5</sup> células HT-144, 2 x 10<sup>5</sup> células SK-Mel-334.2, 5 x 10<sup>4</sup> células B16F10, y 1 x 10<sup>5</sup> 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 intracardiamente 1 x 10<sup>5</sup> 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 intravenosamente a ratones NOD Scid 4 x 10<sup>4</sup> 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 subcutáneamente 1 x 10<sup>6</sup> 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<sup>3</sup>, 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 imaginería 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 inyectar 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 subcutáneamente 5 x 10<sup>4</sup> 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<sup>3</sup>, 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.

- 5 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<sup>3</sup>. 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<sup>5</sup> 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<sup>3</sup>, 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 subcutáneamente 5 x 10<sup>5</sup> 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<sup>3</sup>. 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

- 20 El modelo condicional de progresión de melanoma *Tyr::CreER; B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup> / Tyr::CreER; B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup>* y *Tyr::CreER; B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>*:

- 40 *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'

- 45 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<sup>-/-</sup>*:

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

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

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

Ratones *LXR $\alpha$* <sup>-/-</sup>:

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'

5 Ratones *LXR $\beta$* <sup>-/-</sup>:

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:*

- 10 Para determinar los efectos de GW3965, T0901317, y Bexaroteno en el crecimiento celular *in vitro*, se sembraron 2,5 x 10<sup>4</sup> células de melanoma en triplicado en placas de 6 pocillos y se cultivaron en presencia de DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1  $\mu$ M 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*

- 15 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  $\mu$ M 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  $\mu$ g/mL de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40  $\mu$ g/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*

- 25 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  $\mu$ M durante 56 horas, después de lo cual se sembraron 5 x 10<sup>4</sup> 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<sup>5</sup> células HUVEC en un inserto de migración trans-well de 3,0  $\mu$ m 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  $\mu$ g/mL de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40  $\mu$ g/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*

- 40 Se integraron ARNsh en partículas lentivirales que se prepararon por transfección de 6  $\mu$ g de vector A, 12  $\mu$ g de vector K, y 12  $\mu$ g 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL de puomicina (P8833, Sigma-Aldrich) durante 72 horas.

*Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:*

Humana:

sh<sub>1</sub>LXRα: 5'-

CCGGCCGACTGATGTTCCCACGGATCTCGAGATCCGTGGGAACATCAGTCGGT  
TTTT-3'

sh<sub>2</sub>LXRα: 5'-

CCGGGCAACTCAATGATGCCGAGTTCTCGAGAACTCGGCATCATTGAGTTGCT  
TTTT-3'

sh<sub>1</sub>LXRβ: 5'-

CCGGAGAGTGTATCACCTTCTTGAAGTCTCGAGTTCAAGAAGGTGATACTCTT  
TTTT-3'

sh<sub>2</sub>LXRβ: 5'-

CCGGGAAGGCATCCACTATCGAGATCTCGAGATCTCGATAGTGGATGCCTTCT  
TTTT-3'

shApoE: 5'-

CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGCT  
TTTT-3'

Ratón:

sh\_mLXRα: 5'-

CCGGGCAACTCAATGATGCTGAGTTCTCGAGAACTCAGCATCATTGAGTTGCT  
TTTT-3'

sh\_mLXRβ: 5'-

CCGGTGAGATCATGTTGCTAGAAACCTCGAGGTTTCTAGCAACATGATCTCAT  
TTTTG-3'

sh\_mApoE: 5'-

CCGGGAGGACACTATGACGGAAGTACTCGAGTACTTCCGTCATAGTGTCTCT  
TTTT-3'

5

*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:

10

Humano:

*ApoE* Directo: 5'-TGGGTCGCTTTTGGGATTAC-3'

*ApoE* Inverso: 5'-TTCAACTCCTTCATGGTCTCG-3'

*GAPDH* Directo: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

5 *GAPDH* Inverso: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

*LXR $\alpha$* \_Dir: 5'-GTTATAACCGGGAAGACTTTGC-3'

*LXR $\alpha$* \_Inv: 5'-AAACTCGGCATC ATTGAGTTG-3'

*LXR $\beta$* \_Dir: 5'-TTTGAGGGTATTTGAGTAGCGG-3'

*LXR $\beta$* \_Inv: 5'-CTCTCGCGGAGTGAACACTAC-3'

10 Ratón:

*ApoE* Directo: 5'-GACCCTGGAGGCTAAGGACT-3'

*ApoE* Inverso: 5'-AGAGCCTTCATCTTCGCAAT-3'

*GAPDH* Directo: 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAAT-3'

*GAPDH* Inverso: 5'-GCCTTCTCC ATGGTGGTGAA-3'

15 *LXR $\alpha$*  Directo: 5'-GCGCTCAGCTCTTGTCACT-3'

*LXR $\alpha$*  Inverso: 5'-CTCCAGCCACAAGGACATCT-3'

*LXR $\beta$*  Directo: 5'-GCTCTGCCTACATCGTGGTC-3'

*LXR $\beta$*  Inverso: 5'-CTCATGGCCCAGCATCTT-3'

*ABCA1* Directo: 5'-ATGGAGCAGGGAAGACCAC-3'

20 *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 NheI y SacI. Después, se clonaron elementos multipotenciadores 1 (ME.1) y 2 (ME.2) directamente en 5' del promotor de *ApoE* usando las enzimas de restricción MluI y SacI. Para evaluar la activación transcripcional dirigida por el promotor de *ApoE* y ME.1/ME.2 por los agonistas de LXR, se sembraron  $5 \times 10^4$  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  $1 \mu\text{M}$ , cada condición en cuadruplicado. Para evaluar la activación transcripcional por LXR $\alpha$  o LXR $\beta$ , se sembraron  $5 \times 10^4$  células MeWo que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigido a LXR $\alpha$  o LXR $\beta$  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  $1 \mu\text{M}$ , 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'

40 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, ab15580, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (ab1908, 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).

- 5 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.
- 10 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.

20 *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 coimmunotinción 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.

5 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  
10 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  
20 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  
30 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 DNAJA4 en las células poco metastásicas usando horquillas independientes aumentó significativamente la invasión celular y el reclutamiento endotelial (Figuras 3H-I, 14G), lo que revela que ApoE y DNAJA4 actúan como supresores endógenos  
35 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  
40 llevaron a cabo ensayos para examinar si estos dos genes diana interactúan 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  
45 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  
55 *in vivo*, se realizó la coimmunotinción 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  
60 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 delección 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), mientras 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 delección 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 intravenosamente 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 imaginología bioluminiscente en metástasis pulmonares por  $5 \times 10^4$  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: hidrocloreuro del ácido 3-[3-[N-(2-Cloro-3-trifluorometilbencil)-(2,2-difeniletíl)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  $4 \times 10^4$  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

5 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 imaginería bioluminiscente de la colonización metastásica pulmonar después de la inyección intravenosa de  $4 \times 10^4$  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).

10 La complejidad del cáncer requiere la aplicación de análisis sistemáticos (Pe'er y Hachohen, 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 LXR $\beta$ como una nueva diana terapéutica en melanoma

25 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).

30 Dado el papel supresor de metástasis recientemente descubierto de ApoE en melanoma (Pencheva et al., 2012), la expresión basal ubicua de LXR $\beta$  y RXR $\alpha$  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*.

40 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).

50 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 LXR $\beta$  de melanoma, pero no de LXR $\alpha$ , 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 LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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<sup>3</sup>, 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<sup>3</sup>) (Figura 21A-E), investigamos a continuación si la terapia de activación de LXR podía inhibir el crecimiento de tumores grandes (~150 mm<sup>3</sup>).

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 inhibitorio 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<sup>V600E</sup>*, 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup>* y *Tyr::CreER; B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/+</sup>* como homocigotos para *PTEN Tyr::CreER; B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* (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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>lox/lox</sup>* 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>*, 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<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>*, inyectadas en ratones singénicos inmunocompetentes y prolongó la supervivencia global de ratones que portaban la carga de melanoma *B-Raf<sup>V600E/+</sup>; Pten<sup>-/-</sup>; CDKN2A<sup>-/-</sup>* (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 LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  a ApoE en células de melanoma, la neutralización de ApoE extracelular con un anticuerpo bloqueó completamente la supresión mediada por LXR $\beta$  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 LXR $\beta$ , pero no de LXR $\alpha$ , 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 LXR $\beta$ , 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 LXR $\beta$

La supresión inducida por LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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 LXR $\beta$ .

Consistente con nuestros descubrimientos en células de melanoma humano, la inactivación de LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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 LXR $\alpha$  o LXR $\beta$ . De forma interesante, la ablación genética de LXR $\beta$  sistémica bloqueó la capacidad de GW3965 de suprimir el crecimiento tumoral del melanoma, mientras la inactivación de LXR $\alpha$  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 LXR $\beta$  que para LXR $\alpha$ , se suprimió en ratones LXR $\beta$  *-/-*, pero no en ratones LXR $\alpha$  *-/-* (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 LXR $\beta$  sistémica. De acuerdo con esto, encontramos que LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  en la supresión de metástasis. Concluimos así que los efectos de la activación de LXR $\beta$  en el crecimiento tumoral primario están incitados principalmente a través de la inducción de *ApoE* sistémica, mientras los efectos del agonismo de LXR $\beta$  en la metástasis están mediados a través de la inducción transcripcional de *ApoE* tanto en células de melanoma como en tejidos sistémicos.
- 5
- 10 La identificación de ApoE como el único mediador aguas abajo de la supresión de fenotipos de melanoma inducida por LXR $\beta$  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.
- 15 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 LXR $\beta$ .
- 20
- 25 *Ejemplo 19 La terapia de activación de LXR $\beta$  suprime el crecimiento de melanomas resistentes a dacarbazina y vemurafenib*
- Animados por la capacidad robusta de la terapia de activación de LXR $\beta$  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 LXR $\beta$ .
- 30
- 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 DTIC derivado *in vitro* también era resistente a DTIC *in vivo*, evaluamos los efectos del tratamiento con dacarbazina en el crecimiento tumoral.
- 35
- 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).
- 40
- Estos resultados revelan que el agonismo de LXR $\beta$  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.
- 45
- Ensayamos el impacto de la terapia de activación de LXR $\beta$  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 LXR $\beta$  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).
- 50
- 55

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  $1 \times 10^5$  células/1 mL de medio de privación, y se sembraron 0,5 mL de suspensión celular, que contenía  $5 \times 10^4$  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 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  $\Delta\Delta Ct$ . 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 ( $5 \times 10^4$  células de cáncer renal humano RCC,  $5 \times 10^4$  células de cáncer pancreático humano PANC1, y  $5 \times 10^4$  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  $1 \times 10^5$  células/1 mL de medio de privación, y se sembraron 0,5 mL de suspensión celular, que contenía  $5 \times 10^4$  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.

#### 15 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  $2 \times 10^6$  células de cáncer de mama humano MDA-468 en 50  $\mu$ L de PBS y 50  $\mu$ L 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)<sup>2</sup> 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).

#### 30 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  $\mu$ M 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  $1 \times 10^5$  células/1 mL de medio de privación, y se sembraron 0,5 mL de suspensión celular, que contenía  $5 \times 10^4$  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  $\mu$ M cada uno durante 56 horas. Posteriormente, se sembraron  $5 \times$

- 10<sup>4</sup> 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<sup>5</sup> 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.
- 5
- 10 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*

- 15 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.

- 20 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<sup>4</sup> células de melanoma de ratón B16F10 en 50 µL de PBS y 50 µL de matrigel y la suspensión celular se inyectó subcutáneamente 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<sup>3</sup>, 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)<sup>2</sup> x (diámetro grande)/2.
- 25

- 30 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).

- 35 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.
- 40
- 45

- 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.
- 50
- 55
- 60

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 desregulados 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 (Grellet et al., 2011), así como los efectos protumorigénicos 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 protumorigénica 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.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

<120> MicroARN que Suprime el Melanoma Humano

<130> 070413.20156

<140> PCT/US13/54690

<141> 13-08-2013

<150> 61/784,057

<151> 14-03-2013

<150> 61/682,339

<151> 13-08-2012

<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 cgggtggagac agagccggag cccgagctgc 180  
 gccagcagac cgagtggcag agcggccagc gctgggaact ggcaactgggt cgcttttggg 240  
 attacctgcg ctgggtgcag acaactgtctg agcaggtgca ggaggagctg ctcagctccc 300  
 aggtcaccca ggaactgagg gcgctgatgg acgagaccat gaaggagttg aaggcctaca 360  
 aatcggaact ggaggaacaa ctgacccccg tggcggagga gacgcgggca cggctgtcca 420  
 aggagctgca ggcggcgag gcccggtgg gcgcggacat ggaggacgtg tgcggccgcc 480  
 tgggtgcagta ccgcggcgag gtgcaggcca tgctcggcca gagcaccgag gagctgcggg 540  
 tgcgcctcgc ctcccacctg cgcaagctgc gtaagcggct cctccgcgat gccgatgacc 600  
 tgcagaagcg cctggcagtg taccaggccg gggcccgcga gggcggcgag cgcggcctca 660  
 gcgccatccg cgagcgcctg gggcccctg tggaacaggg ccgcgtgcgg gccgccactg 720  
 tgggctccct ggccggccag ccgctacagg agcgggcca ggcctggggc gagcggctgc 780  
 gcgcgcggat ggaggagatg ggcagccgga cccgcgaccg cctggacgag gtgaaggagc 840  
 aggtggcggg ggtgcgcgcc aagctggagg agcaggccca gcagatacgc ctgcaggccg 900  
 aggccttcca ggcccgcctc aagagctggt tcgagcccct ggtggaagac atgcagcgcc 960  
 agtgggccgg gctgggtggag aaggtgcagg ctgccgtggg caccagcgcc gccctgtgc 1020  
 ccagcgacaa tcaactgaac ccgaagcctg cagccatgcg accccacgcc accccgtgcc 1080

ES 2 765 573 T3

tcctgcctcc ggcgagcctg 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

ES 2 765 573 T3

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																			
agucccacc	uucggcgag	ggcuccggc	aacacagccc	uccaggccgc	cuacucucca														60
gccagccggc	uccacggacc	cacggaaggg	caagggggcg	gccucggggc	ggcgggacag														120
uugucggagg	gcgcccucca	ggcccaagcc	gcuucuccg	gccccgccca	uggccccggg														180
cggcagucag	agcuggagcu	ccggggauc	agacgggcag	ccaaaggagc	agacgcccga														240
gaagcccaga	cacaagaugg	ugaaggagac	ccaguacuau	gacauccugg	gcgugaagcc														300
cagcgcgucc	ccggaggaga	ucaagaaggg	cuaucggaag	cuggcgcuca	aguaccacc														360
ggacaagaac	ccggaugagg	gcgagaaguu	uaaacucaua	ucccaggcau	augaaugcu														420
uucagaucca	aagaaaaggg	auguuuuga	ccaaggcgga	gagcaggcaa	uuaaagaagg														480
aggcucaggg	agccccagcu	ucucuucacc	cauggacauc	uuugacaugu	ucuuuggugg														540
ugguggacgg	auggcuagag	agagaagagg	caagaauguu	guacaccagu	uaucuguaac														600
ucuugaagau	cuauuaaug	gagucacgaa	gaaauuggcc	cuccagaaaa	auguaauuug														660
ugagaaaugu	gaagguguug	gugggaagaa	gggaucggug	gagaagugcc	cgucugucgaa														720
ggggcggggg	augcagaucc	acauccagca	gaucggggccg	ggcaugguac	agcagaucca														780

ES 2 765 573 T3

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	ucuuguuuuu	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	ggaguuuuugu	cccaaugagc	agaacuggcg	1380
ucagcacagg	gaggccuacg	aggaggacga	agacgggcc	caggcuggag	ugcagugcca	1440
gacggcauga	cguggugcgg	ggcagcgugg	ccccaccgga	cuagcacaug	augaauguaa	1500
aguuggcaca	augaaaauga	caucgcuua	auggccuugu	guuugggaur	uccuguguau	1560
guguucagca	uucuaauug	cugagugucu	uuuuggcuuu	ucuuuugguu	guaacuuaag	1620
uuauagcuua	auuuauuuu	aaauguuua	aguauaaauc	accucuaguc	ugcauauugga	1680
aucuguucau	uucuauuuuc	aggauauacu	uuugagaugu	cagugauugc	accaauacuu	1740
ugugcuucua	guggcuuugc	cauaauucag	ugucaccaau	aaggcacagc	ccaguuaagca	1800
gcuuagcccc	ccuagcaaac	cccaaggcac	aaagugggca	uccugacuca	ucucuagguc	1860
ugugguuucu	ccccucuucc	cuuggcagag	uuauugaggg	caugaucuca	gggcugcuaa	1920
gauaacuuu	cugaggauuc	uagaugaucc	ucuuaaagaa	uaaaagcaca	uccguggauc	1980
ggacauggcu	gcaugugccu	gcuuaacagg	gccaacuua	uuccuacugu	ucugugcccu	2040
ucaguggaug	gaacgugagu	gucugaucau	cucucuugga	aguuuucuga	accuuccaag	2100
cucuguggug	aggacaaacc	aguguuugaa	ucauauugc	auaacuguuu	gccugugacc	2160
cucacaccuu	guucuucagg	guuuuaauga	uuuucuguug	acaacuuiuug	caaugcuuuc	2220
ccaccaaagu	gcuuacuugu	aaagaaaacu	aaauccuucu	guguccccgg	cagccucagu	2280
gcagcaacag	aagccaaggg	agaauugcgc	ugguuuggcc	cauggcacag	ccagcuucuc	2340
ugaccaguaa	uccgggguga	cuugaggguc	ugcaaaggca	uagaacuccc	caguguuuuc	2400
caccucauuc	ucccagauug	agcucccuuc	caaaggauug	uuccucucau	ugcacagcca	2460
uauuacaaag	gguuuccugc	ucaagugaug	uuuugguaag	aacuucgcug	aguuccacug	2520
uggauuacag	uuuguauugga	cuacuacugu	aaauuauagc	uuguuuggag	ggauuuuagu	2580
cauuuuuuua	uucaugacag	guagacuaca	auucgaacu	aggguuaccu	cagucuuuag	2640
ccauuacugc	uuuuuucuuu	uccccaaguc	acaaaaacu	uguaagcugc	uggguuaaag	2700

ES 2 765 573 T3

cagaggccac cugucagauc uaccuaccc uuauuugguu acauggcacc ugagaguuu 2760  
 acucagacca gggauucuucc uuaggagggg caaagugcag aucagaccou gcagguaagg 2820  
 ugaaccagcu gcacggacca gguucccgca aaacauugcc agcuagugag gcauaauuu 2880  
 cucaaaguau agaaacagcc caccugugcc cacuuugacc auuggugagg auagauauaa 2940  
 aaucacuucu uccaacgaag ccuaggugaa aaucuauuu uaaauggacc acaacucugg 3000  
 ggugucguuu uugugcugug acuuccuaau uauugcuaaa gaacuacugu uuaguuggua 3060  
 augguguaaa auuacauuca gcuccuucuu gucauauaaa aggaauuugg agggugucgc 3120  
 uuaaaauuu auuccaccug uacauuuguc acuuuauuu uaaaauugag cugguauagag 3180  
 agauaaaaaa aaaaaaaaaaaa 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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  
 ggcagggggcg uccggggcgc ucugaccggc cucgcccgcc cccccgcag acacaagaug 120  
 gugaaggaga cccaguacua ugacauccug ggcgugaagc ccagcgcguc cccggaggag 180  
 aucaagaagg ccuauvcgaa gcuggcgcuc aaguaccacc cggacaagaa cccggaugag 240  
 ggcgagaagu uuaaacucan aucccaggca uaugaagugc uuucagaucc aaagaaaagg 300  
 gauguuuauug accaaggcgg agagcaggca auuaaagaag gaggcucagg cagccccagc 360  
 uucucuucac ccauggacau cuuugacaug uucuuuggug gugguggacg gauggcuaga 420  
 gagagaagag gcaagaaugu uguacaccag uuauvcguaa cucuugaaga ucuaauaaau 480  
 ggagucacga agaaauvgc ccuccagaaa aauguaauuu gugagaaug ugaagguguu 540  
 ggugggaaga agggauvcgu ggagaagugc ccgcugugca aggggcgggg gaugcagauc 600  
 cacauvcagc agauvcggcc gggcauggua cagcagauc agaccgugug caucgagugc 660  
 aagggccagc gugagvcgau caaccccaag gaccgcugcg agagcugcag cggggccaag 720  
 gugauvcgug agaagaagau uauvcaggua cauguugaaa aagguaugaa agauvcggcaa 780  
 aagauvcuau ucauvcgaga aggagauvcag gagccugagc uggagccugg ugaugcuaua 840  
 auugugcuug auvcagaagga ucauvcgugc uuucagagac gaggccauga cuugauvcag 900  
 aaaauvcgaaa uucagcuuuc ugaagcuuu uguggcuuca agaagacgau aaaaacauvc 960  
 gacaaucgaa uucuuvcuuau uacauvcgaaa gcaggugagg ugauvcagca cggggaccug 1020  
 agauvcgugc gcgauvcagc aaugcccauc uacaaagcac ccucggaaa agggauvcug 1080  
 aucauvcagu uuuuvcgaa cuuucvcgaa aaacacuggc uuucucugga aaagcuvcu 1140  
 cagcugcgaag cuuucacucc uccucgacag aaagugagga uuacagauga cauvcgagc 1200  
 guggagvcuga aggaguuuug ucccavagc cagaacuggc gucagcacag ggaggccuvc 1260  
 gaggagvcagc aagacvcggcc ccagvcguga guvcagugcc agacvcgavc acgugvcgvc 1320  
 gggcagvcgug gccccaccvc acuagcacau gavgaaugua aaguvcgac auvcgaaaug 1380  
 acauvcgcuuu aaugvcccuug uguuvcggav guccugugua uguguvcagc auvcuuvcuu 1440

ES 2 765 573 T3

gcugaguguc uuuuuggcuu uucuuuuggu uguaacuuaa guuauagcuu aauuuauuu 1500  
 uaaauguuuu aaguauaaa caccucuagu cugcauauagg aaucuguuca uuucuauuuu 1560  
 caggauauac uuuugagaug ucagugauug caccaauacu uugugcuucu aguggcuuug 1620  
 ccuaauuua gugucaccaa uaaggcacag cccaguuagc agcuuagccc cccuagcaaa 1680  
 cccaaggca caaagugggc auccugacuc aucucuaggu cugugguuuc uccccucuuc 1740  
 ccuuggcaga guuauugagg gcaugaucuc agggcugcua agauaacauu ucugaggauu 1800  
 cuagauugauc cucuuaaaaga auaaaagcac auccguggau cggacauggc ugcaugugcc 1860  
 ugcuuuacag ggccaacuua guuccuacug uucugugccc uucaguggau ggaacgugag 1920  
 ugucugauca ucucucuugg aaguuuucug aaccuuccaa gcucuguggu gaggacaaac 1980  
 caguguuuga aucuauugcu gauaacuguu ugccugugac ccucacaccu uguucuucag 2040  
 gguuuuaaug auuuucuguu gacaacuuuu gcaaugcuuu cccaccaaaug ugcuuacuug 2100  
 uaaagaaaac uaaauccuuc ugugucuccg gcagccucag ugcagcaaca gaagccaagg 2160  
 gagaauugcug cugguuuggc ccauggcaca gccagcuucu cugaccagua auccggggug 2220  
 acuugagggg cugcaaaggc auagaacucc ccaguguuuu ccaccucauu cccccagauu 2280  
 gagcuccuuu ccaaaggau cguuccucuca uugcacagcc auuuuacaaa ggguuuccug 2340  
 cucaagugau guuuugguaa gaacuucgcu gaguuccacu guggauuaca guuuugauagg 2400  
 acuacuacug uaaauuauag cuuguuugga gggauuuuag ucauuuuuu auucaugaca 2460  
 gguagacuac aaaucgacu uaggguuacc ucagucuuua gccauuacug cuuuuuucuu 2520  
 ucccccaagu cacaaaaaac uuguaagcug cuggguuuua gcagaggcca ccugucagau 2580  
 cuaccuacc cuuuuuuggu uacauggcac cugagaguuu cacucagacc agggauucuuc 2640  
 cuuaggaggg ucaaagugca gaucaagcca ugcagguaag gugaaaccagc ugcaaggacc 2700  
 agguucccgc aaaacauugc cagcuaguga ggcauuuuu gcucuaaqua uagaaacagc 2760  
 ccaccugugc ccacuuugac cauuggugag gauagauua aaaucacuuc uuccaacgaa 2820  
 gccuagguga aaaucuuuu auaaauggac cacuacucug gggugucguu uuugugcugu 2880  
 gacuuccuaa uuauugcuaa agaacuacug uuuauguugu aaugguguaa aauuacauuc 2940  
 agcuccuucu ugucauuaa aaggaaauug gagggugucg cuuuuuuuu uauuccaccu 3000  
 guacauuugu cacuuuuaaa uuuuuuuga gcugguaua gagauaaaaa aaaaaaaaaa 3060  
 aaaa 3064

<210> 6  
 <211> 397  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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 caggucaaaau 60  
 cucagcacuc acaagauuuu aacucauauc ccaggcauau gaagugcuuu cagaucctaaa 120  
 gaaaagggau guuuugacc aaggcggaga gcaggcauu aaagaaggag gcucaggcag 180  
 ccccagcuuc ucuucacca uggacaucuu ugacauguuc uuugguggug guggacggau 240  
 ggcuagagag agaagaggca agaauguugu acaccaguua ucuguaacuc uugaagauuc 300  
 auauaaugga gucacgaaga aauggcccu ccagaaaaau guauuuugug agaaauguga 360  
 agguguuggu gggaagaagg gaucggugga gaagugcccg cugugcaagg ggcggggggu 420  
 gcagaucac auccagcaga ucgggccggg caugguacag cagaucaga ccgugugcau 480  
 cgagugcaag ggccaggug agcgcauaa cccaaggac cgcugcgaga gcugcagcgg 540  
 ggccaaggug auccgugaga agaagauuau cgagguacau guugaaaaag guaugaaaga 600

ES 2 765 573 T3

ugggcaaaaag	auacuauuuuc	auggagaag	agaucaggag	ccugagcugg	agccugguga	660
ugucauaaau	gugcuugauc	agaaggauca	uagugucuuu	cagagacgag	gccaugacuu	720
gaucaugaaa	augaaaauuc	agcuuucuga	agcucuuugu	ggcuucaaga	agacgauaaa	780
aacauuggac	aaucgaauuc	uuguuauuac	auccaaagca	ggugagguga	uaaagcacgg	840
ggaccugaga	ugcgugcgcg	augaaggaau	gcccaucuc	aaagcacccc	uggaaaaagg	900
gauucugauc	auacaguuuu	uaguaaucuu	uccugaaaaa	cacuggcuuu	cucuggaaaa	960
gcuuccucag	cuggaagcuu	uacucccucc	ucgacagaaa	gugaggauua	cagaugacau	1020
ggaucaggug	gagcugaagg	aguuuugucc	caaugagcag	aacuggcguc	agcacagggg	1080
ggccuacgag	gaggacgaag	acgggcccc	ggcuggagug	cagugccaga	cggcaugacg	1140
uggugcgggg	cagcguggcc	ccaccggacu	agcacaugau	gaauguaaag	uuggcacaau	1200
gaaaaugaca	ucgcuuuuau	ggccuugugu	uugggauguc	cuguguaugu	guucagcauu	1260
cuuauugcu	gagugucuuu	uuggcuuuuc	uuuugguugu	aacuuuaguu	auagcuuauu	1320
uuauuuuaa	auguuuuuag	uauaaaucac	cucuagucug	cauauuggaau	cuguucauuu	1380
cuauuuucag	gauauacuuu	ugagauguca	gugauugcac	caauacuuug	ugcuucuaqu	1440
ggcuuugcca	uaauucagug	ucaccaauaa	ggcacagccc	aguuagcagc	uuagcccccc	1500
uagcaaaccc	caaggcacia	agugggcauc	cugacucauc	ucuaaggucug	ugguuucucc	1560
ccucuucccu	uggcagaguu	auugagggca	ugaucucagg	gcugcuaaga	uaacauuucu	1620
gaggauucua	gaugauccuc	uuaaagaaua	aaagcacauc	cguggaucgg	acauggcugc	1680
augugccugc	uuuacagggc	caacuuaquu	ccuacuguuu	ugugcccuuc	aguggaugga	1740
acgugagugu	cugaucuucu	cucuuggaag	uuuucugaac	cuuccaagcu	cuguggugag	1800
gacaaaccag	uguuugaauc	auaugcugau	aacuguuugc	cugugacccu	cacaccuugu	1860
ucuuacaggu	uuuaaugauu	uucuguuugc	aacuuuuugc	augcuuuucc	accaaagugc	1920
uuacuuguaa	agaaaacuaa	auccuucugu	guccccggca	gccucagugc	agcaacagaa	1980
gccaaaggag	aaugcugcug	guuuggccca	uggcacagcc	agcuucucug	accaguaauc	2040
cggggugacu	ugagggucug	caaaggcaua	gaacucccca	guguuuucca	ccucauucuc	2100
ccagauugag	cucccuucca	aaggauvcgu	ccucucuuug	cacagccaua	uuacaaagg	2160
uuuccugcuc	aagugauguu	uugguaagaa	cuucgcugag	uuccacugug	gauuacaguu	2220
uguauuggacu	acuacuguaa	auuauagcuu	guuuggaggg	auauuaguca	uuuuuuuuu	2280
caugacaggu	agacuacaau	ucgaacuuag	gguuaccuca	gucuuuagcc	auuacugcuu	2340
auuucuuuuc	cccaagucac	aaaaaacuug	uaagcugcug	gguuuuaagca	gaggccaccu	2400
gucagauca	cccuacccuu	auuugguuac	auggcaccug	agaguuuucac	ucagaccagg	2460

ES 2 765 573 T3

gaucuuccuu aggaggguca aagugcagau cagaccaugc agguaaggug aaccagcugc 2520  
 acggaccagg uucccgcaaa acauugccag cuagugaggc auaauuugcu caaaguauag 2580  
 aaacagccca ccugugccca cuuugaccau uggugaggau agauauaaaa ucacuucucuc 2640  
 caacgaagcc uaggugaaaa ucuauuuaua aauggaccac aacucugggg ugucguuuuu 2700  
 gugcugugac uuccuaauua uugcuaaaga acuacuguuu aguugguaau gguguaaaa 2760  
 uacauucagc uccuucuugu cauauaaaag gaauuuggag ggugucgcuu aaaauuuuau 2820  
 uccaccugua cauugucac uuuaaaauua aaauugagcu gguaugagag auaaaaaaaaa 2880  
 aaaaaaaaa 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

cagcggugcg agcuccaggc ccaugcacug aggaggcgga aacaagggga gccccagag 60  
cuccaucaag cccccuccaa aggcucuccu acccggucca cccccccac cccccuccc 120  
cgccuccucc caauugugca uuuuugcagc cggaggcggc uccgagaugg ggcugugagc 180  
uucgcccggg gagggggaaa gagcagcgag gagugaagcg gggggguggg gugaaggguu 240  
uggauuucgg ggcagggggc gcacccccgu cagcaggccc uccccaaggg gcucggaacu 300  
cuaccucuuc acccacgccc cuggugcgcu uugccgaagg aaagaauaag aacagagaag 360  
gaggaggggg aaaggaggaa aagggggacc cccaacugg ggggggugaa ggagagaagu 420  
agcaggacca gaggggaagg ggcugcugcu ugcaucagcc cacaccaugc ugaccccgcc 480  
guugcuccug cugcugcccc ugcucucagc ucuggucgcg gcggcuaucg acgccccuaa 540  
gacuugcagc cccaagcagu uugccugcag agaucaaua accuguaucu caaagggcug 600  
gcggugcgac ggugagaggg acugcccaga cggaucugac gaggcccug agauuugucc 660  
acagaguaag gcccagcgau gccagccaaa cgagcauaac ugccugggua cugagcugug 720  
uguuuccaug ucccgccucu gcaauggggu ccaggacugc auggacggcu cagaugaggg 780  
gccccacugc cgagagcucc aaggcaacug cucucgccug ggcugccagc accauugugu 840  
ccccacacuc gaugggccc aacugcuacug caacagcagc uuucagcuuc aggcagaugg 900  
caagaccugc aaagauuuug augagugcuc aguguacggc accugcagcc agcuavgcac 960  
caacacagac ggcuccuua 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 cuccucagu cugcaccacg uggaacagau 1320  
ggccaucgac uggcugacag gcaacuucua cuuuguggau gacaucgaug auaggauuu 1380  
ugucugcaac agaaaugggg acacaugugu cacauugcua gaccuggaac ucuacaacc 1440  
caagggcauu gcccuggacc cugccauggg gaagguguuu uucacugacu augggcagau 1500  
cccaaaggug gaacgcugug acauggaugg gcagaaccgc accaagcucg ucgacagcaa 1560  
gauuguguuu ccucauggca ucacgcugga ccuggucagc cgccuugucu acugggcaga 1620  
ugccuauucug gacuauuuug aaguggugga cuaugagggc aagggccgcc agaccaucau 1680  
ccagggcauc cugauugagc accuguacgg ccugacugug uuugagaauu aucucuavgc 1740  
caccaacucg gacaaugcc auggcccagca gaagacgagu gugauccgug ugaaccgcuu 1800  
uaacagcacc gaguaccagg uugucacccg gguggacaag gguggugccc uccacaucua 1860  
ccaccagagg cgucagcccc gagugaggag ccaugccugu gaaaacgacc aquaugggaa 1920

ES 2 765 573 T3

gccggguggc	ugcucugaca	ucugccugcu	ggccaacagc	cacaaggcgc	ggaccugccg	1980
cugccguucc	ggcuucagcc	ugggcaguga	cgggaaguca	ugcaagaagc	cggagcauga	2040
gcuguuccuc	guguauggca	agggccggcc	aggcaucauc	cggggcaugg	auaugggggc	2100
caaggucicc	gaugagcaca	ugaucuccau	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
agacuggggag	gaggacccca	aggacagucg	gcguggggcg	cuggagaggg	cguggaugga	2520
uggcucacac	cgagacaucu	uugucaccuc	caagacagug	cuuuggccca	augggcuaag	2580
ccuggacauc	ccggcugggc	gccucuacug	gguggaugcc	uucucgacc	gcaucgagac	2640
gauacugcuc	aauggcacag	accggaagau	uguguaugaa	gguccugagc	ugaaccacgc	2700
cuuuggccug	ugucaccaug	gcaacuaccu	cuucuggacu	gaguaucgga	guggcagugu	2760
cuaccgcuug	gaacggggug	uaggaggcgc	acccccacu	gugacccuuc	ugcgaguga	2820
gcgccccccc	aucuuugaga	uccgaaugua	ugaugcccag	cagcagcaag	uuggcaccaa	2880
caaaugccgg	gugaacaau	gcggcugcag	cagccugugc	uuggccaccc	cugggagccg	2940
ccagugcgcc	ugugcugagg	accagguguu	ggacgcagac	ggcgucacuu	gcuuggcgaa	3000
cccauceuac	gugccuccac	cccagugcca	gccagggcag	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	aucuccaucu	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
gcuugcauc	cccagcacu	ggaccugcga	uggggacaau	gacugcggag	acuacaguga	3600
ugagacacac	gccaacugca	ccaaccaggc	cacgaggccc	ccugguggcu	gccacacuga	3660
ugaguuccag	ugccggcugg	auggacuau	caucuccucg	cgguggcgcu	gcgauuggga	3720
cacugacugc	auggacucca	gcgauagaaa	gagcugugag	ggagugaccc	acgucugcga	3780

ES 2 765 573 T3

ucccaguguc	aaguuuuggcu	gcaaggacuc	agcucggugc	aucagcaaag	cgugggugug	3840
ugauggcgac	aaugacugug	aggauaacuc	ggacgaggag	aacugcgagu	cccuggccug	3900
caggccaccc	ucgcacccuu	gugccaacia	caccucaguc	ugccugcccc	cugacaagcu	3960
gugugauggc	aacgacgacu	guggcgacgg	cucagaugag	ggcgagcucu	gcgaccagug	4020
cucucugaau	aacgguggcu	gcagccacia	cugcucagug	gcaccuggcg	aaggcauugu	4080
guguuccugc	ccucugggca	uggagcuggg	gcccgaciac	cacaccugcc	agauccagag	4140
cuacugugcc	aagcaucuca	aaugcagcca	aaagugcgac	cagaacaagu	ucagcgugaa	4200
gugcuccugc	uacgagggcu	ggguccugga	accugacggc	gagagcugcc	gcagccugga	4260
ccccuuaag	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	uacuggggug	agaguaaccu	4560
ggaucagauc	gagguggcca	agcuggaugg	gaccuccggg	accaccugc	uggccgguga	4620
cauugagcac	ccaagggcaa	ucgcacugga	uccccgggau	gggauccugu	uuuggacaga	4680
cugggaurcc	agccugcccc	gcauugaggc	agccuccaug	aguggggcug	ggcgccgcac	4740
cgugcaccgg	gagaccggcu	cuggggggcug	gcccacgggg	cucaccgugg	acuaccugga	4800
gaagcgcauc	cuuuggauug	acgccagguc	agaugccauu	uacucagccc	guuacgacgg	4860
cucuggccac	auggaggugc	uucggggaca	cgaguuccug	ucgcaccgcu	uugcagugac	4920
gcuguacggg	ggggaggucu	acuggacuga	cuggcgaaca	aacacacugg	cuaaggccaa	4980
caaguggacc	ggccacaau	ucaccguggu	acagaggacc	aacaccagc	ccuuugaccu	5040
gcagguguac	caccuccucc	gccagcccac	ggcucccac	cccugugagg	ccaauggggg	5100
ccagggcccc	ugcucccacc	ugugucucac	caacuacaac	cggaccgugu	ccugcgccug	5160
ccccaccuc	augaagcucc	acaaggacia	caccaccugc	uauaguuua	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	aagcuauzac	accaauaaga	agcagaucaa	5520
uguggccccg	cuggauggcu	ccuucaagaa	cgcaguggug	cagggccugg	agcagcccca	5580
uggccuuguc	guccaccuc	ugcgugggaa	gcucuacugg	accgauggug	acaacaucag	5640
cauggccaac	auggauggca	gcaaucgcac	ccugcucuuc	aguggccaga	agggccccgu	5700

ES 2 765 573 T3

gggccuggcu auugacuucc cugaaagcaa acucuacugg aucagcuccg ggaaccauac 5760  
 caucaaccgc ugcaaccugg augggagugg gcuggagguc aucgaugcca ugcggagcca 5820  
 gcugggcaag gccaccgccc uggccaucan gggggacaag cugugggugg cugaucaggu 5880  
 gucggaaaag augggcacau gcagcaaggc ugacggcucg ggcuccgugg uccuucggaa 5940  
 cagcaccacc cuggugaugc acaugaaggu cuaugacgag agcauccagc uggaccauaa 6000  
 gggcaccaac ccucgagug ucaacaacgg ugacugcucc cagcucugcc ugcccacguc 6060  
 agagacgacc cgcuccugca ugugcacagc cggcuauagc cuccggagug gccagcaggc 6120  
 cugcgagggc guagguuccu uucuccugua cucugugcau gagggaauca ggggaaaucc 6180  
 ccuggauccc aaugacaagu cagaugcccu ggucccagug uccgggaccu cgcuggcugu 6240  
 cggcaucgac uuccacgucg aaaaugacac caucuacugg guggacaugg gccugagcac 6300  
 gaucagccgg gccaaagcggg accagacgug gcgugaagac guggugacca auggcauugg 6360  
 ccguguggag ggcuuugcag uggacuggau cgcaggcaac aucuacugga cagaccaggg 6420  
 cuuugauguc aucgaggucg cccggcucua uggcuccuuc cgcuaacgugg ugaucuccca 6480  
 gggucuagac aagccccggg ccaucaccgu ccaccgggag aaaggguacu uguucuggac 6540  
 ugaguggggu caguauccgc guauugagcg gucucggcua gauggcacgg agcguguggu 6600  
 gcuggucaac gucagcauca gcuggcccaa cggcaucuca guggacuacc aggaugggaa 6660  
 gcuguacugg ugcgaugcac ggacagacaa gauugaacgg aucgaccugg agacagguga 6720  
 gaaccgagag gugguucugu ccagcaaca cauggacaug uuuucagugu cuguguuuga 6780  
 ggauuucauc uacuggagug acaggacuca ugccaacggc ucuaucaagc gcgggagcaa 6840  
 agacaaugcc acagacuccg ugccccugcg aaccggcauc ggcguccagc uaaaagacau 6900  
 caaagucuuc aaccgggacc ggcagaaagg caccaacgug ugcgcggugg ccaauggcgg 6960  
 gugccagcag cugugccugu accggggccg ugggcagcgg gccugcgccu gugcccacgg 7020  
 gaugcuggcu gaagacggag caucgugccg cgaguaugcc ggcuaaccugc ucuaucaga 7080  
 gcgcaccauu cucaagagua uccaccuguc ggaugagcgc aaccucaaug cgcgggugca 7140  
 gcccuucgag gaccucgagc acaugaagaa cgucaucgcc cuggccuuug acuaccgggc 7200  
 aggcaccucu ccgggcaccc ccaaucgcau cuucucagc gacauccacu uugggaacau 7260  
 ccaacagauc aacgacgag gcuccaggag gaucaccauu guggaaaacg ugggcuccgu 7320  
 ggaaggccug gccuauacc guggcuggga cacucucuau uggacaagcu acacgacauc 7380  
 caccaucagc cgccacacag uggaccagac cggcccaggg gccuucgagc gugagaccgu 7440  
 caucacuaug ucuggagaug accaccacg ggccuucguu uuggacgagu gccagaaccu 7500  
 cauguucugg accaacugga augagcagca ucccagcauc augcgggccc cgcucucggg 7560

ES 2 765 573 T3

agccaauguc cugacccuua ucgagaagga cauccguacc cccaauaggcc uggccaucga 7620  
 ccaccgugcc gagaagcucu acuucucuga cgccaccucg gacaagaucg agcggugcga 7680  
 guaugacggc ucccaccgcu augugauccu aaagucagag ccuguccacc ccuucgggcu 7740  
 ggccgugua uggggagcaca uuuucuggac ugacugggug cggcgggagcag ugcagcgggc 7800  
 caacaagcac gugggagca acaugaagcu gcugcgugug gacaucaccc agcagcccau 7860  
 gggcaucauc gccguggcca acgacaccaa cagcugugaa cucucuccau gccgaaucaa 7920  
 caacgguggc ugccaggacc ugugucugcu cacucaccag ggccauguca acugcucaug 7980  
 ccgagggggc cgaauccucc aggaugaccu caccugccga gcggugaaau ccucugccg 8040  
 agcacaagau gaguuugagu gugccaauagg cgagugcauc aacuucagcc ugaccugcga 8100  
 cggcgucucc cacugcaagg acaaguccga ugagaagcca uccuacugca acucccgccg 8160  
 cugcaagaag acuuuccggc agugcagcaa ugggcgugug guguccaaca ugcuguggug 8220  
 caacggggcc gacgacugug gggauaggcuc ugacgagauc ccuugcaaca agacagccug 8280  
 uggugugggc gaguuccgcu gccgggagcg gaccugcauc gggaacucca gccgcugcaa 8340  
 ccaguuugug gauugugagg acgccucaga ugagaugaac ugcagugcca ccgacugcag 8400  
 cagcuacuuc cgccuggggc ugaagggcgug gcucuuccag ccugcgagc ggaccucacu 8460  
 cugcuacgca ccagcuggg ugugugaugg cgccaugac uguggggacu acagugauga 8520  
 gcgagcugc ccagguguga aacgccccag augccucug aauuacuucg ccugcccuag 8580  
 ugggcgugc aucccauga gcuggacgug ugacaaagag gaugacugug aacauggcga 8640  
 ggacgagacc cacugcaaca aguucugcuc agaggcccag uuugagugcc agaaccaucg 8700  
 cugcaucucc aagcaguggc ugugugacgg cagcgaugac uguggggaug gcucagacga 8760  
 ggcugcucac ugugaaggca agacgugcgg cccuccucc 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 gaguccccc agugugagua cccgaccugc ggcccagug aguuccgug 9060  
 ugccaauagg cgucugucuga gcucccgcca gugggagugu gauggcgaga augacugcca 9120  
 cgaccagagu gacgaggcuc ccaagaacc acacugcacc agccaagagc acaagugcaa 9180  
 ugccucguca caguuccugu gcagcagugg gcgugugug 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 gcuuaaagug 9480

ES 2 765 573 T3

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
gaugcacuu	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
ugaccuuca	cugaucggcc	gcaucggcgu	ggauugguuc	agccgcagcg	ucaucgugga	10020
caccaagauc	acauggccca	augggcugac	gcuggacuau	gucacugagc	gcaucuacug	10080
ggccgacgcc	cgcgaggacu	acauugaauu	ugccagccug	gauggcucca	aucgccacgu	10140
ugugcugagc	caggacaucc	cgcacauuu	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	ggcacaauug	ugccugcccc	accaacuucu	accuggggcag	10440
cgauggggcg	accugugugu	ccaacugcac	ggcuagccag	uuuguaugca	agaacgacaa	10500
gugcaucccc	uucuggugga	agugugacac	cgaggacgac	ugcggggacc	acucagacga	10560
gcccccgac	ugcccugagu	ucaagugccg	gcccggacag	uuccagugcu	ccacagguau	10620
cugcacaac	ccugccuuca	ucugcgaugg	cgacaauugac	ugccaggaca	acagugacga	10680
ggccaacugu	gacauccacg	ucugcuugcc	cagucaguuc	aaaugcacca	acaccaaccg	10740
cuguauucc	ggcaucuucc	gcugcaauug	gcaggacaac	ugcggagaug	gggaggauga	10800
gagggacugc	cccgagguga	ccugcgcccc	caaccaguuc	cagugcucca	uuaccaaaccg	10860
gugcaucccc	cgggucuggg	ucugcgaccg	ggacaauugac	uguguggaug	gcagugauga	10920
gccccccaac	ugcaccaga	ugaccugugg	uguggacgag	uuccgcugca	aggauucggg	10980
ccgcugcauc	ccagcgcguu	ggaaguguga	cgagaggau	gacugugggg	auggcucgga	11040
ugagcccagg	gaagagugug	augaacgcac	cugugagcca	uaccaguucc	gcugcaagaa	11100
caaccgcugc	gugcccggcc	gcuggcagug	cgacuacgac	aacgauugcg	gugacaacuc	11160
cgaugaagag	agcugcacc	cucggcccug	cuccgagagu	gaguucuccu	gugccaaccg	11220
ccgcugcauc	gcggggcgcu	ggaaauugca	uggagaccac	gacugcgcg	acggcucgga	11280
cgagaaagac	ugcacccccc	gcugugacau	ggaccaguuc	cagugcaaga	gcggccacug	11340

ES 2 765 573 T3

cauacccug cgcuggcgcgcu gugacgcaga cgccgacugc auggacggca gcgacgagga 11400  
ggccugcggc acuggcgcguc ggaccugccc ccuggacgag uuccagugca acaacacuuu 11460  
gugcaagccg cuggccugga agugcgaugg cgaggaugac uguggggaca acucagauga 11520  
gaaccccgag gagugugccc gguucgugug cccucccaac cggcccuucc guugcaagaa 11580  
ugaccgcguc ugucugugga ucgggcgcca augcgauggc acggacaacu guggggauug 11640  
gacugaugaa gaggacugug agccccccac agcccacacc acccaccugca aagacaagaa 11700  
ggaguucug ugccggaacc agcgcugccu cuccuccucc cugcgcugca acauguucga 11760  
ugacugcggg gacggcucug acgaggagga cugcagcauc gaccccaagc ugaccagcug 11820  
cgccaccaau gccagcaucu guggggacga ggcacgcugc gugcgcaccg agaaagcggc 11880  
cuacugugcc ugccgcucgg gcuuccacac cgugcccggc cagcccggau gccaaagacau 11940  
caacgagugc cugcgcuuuc gcaccugcuc ccagcucugc aacaacacca agggcggcca 12000  
ccucugcagc ugcgucugga acuucaugaa gacgcacaac accugcaagg ccgaaggcuc 12060  
ugaguaccag guccuguaca ucgcugauga caaugagauc cgcagccugu uccccggcca 12120  
ccccauucg gcuuacgagc aggcuuucca gggugacgag aguguccgca uugaugcuau 12180  
ggauguccau gucaaggcug gccgugucua uuggaccaac uggcacacgg gcaccaucuc 12240  
cuaccgcagc cugccaccug cugcgcuccc uaccacuucc aaccgccacc ggcgacagau 12300  
ugaccggggg gucaccacc ucaacauuuc agggcugaag augcccagag gcaucgccau 12360  
cgacugggug gccggaaacg uguacuggac cgacucgggc cgagauguga uugagguggc 12420  
gcagaugaag ggcgagaacc gcaagacgcu caucucgggc augauugacg agccccacgc 12480  
cauuguggug gaccacuga gggggaccu guacugguca gacuggggca accaccccaa 12540  
gauugagacg gcagcgaugg augggacgcu ucgggagaca cuggugcagg acaacauuca 12600  
guggcccaca ggccugggcg uggauuauca caaugagcgg cuguacuggg cagacgccaa 12660  
gcuucaguc aucggcagca uccggcucua uggcacggac cccauugugg cugcugacag 12720  
caaacgaggc cuaagucacc ccuucagcau cgacgucuuu gaggauuaca ucuauggugu 12780  
caccuacauc aauaaucgug ucuucaagau ccuaaguuu ggccacagcc ccuuggucaa 12840  
ccugacaggg ggccugagcc acgccucuga cgugguccuu uaccaucagc acaagcagcc 12900  
cgaagugacc aacccaugug accgcaagaa augcgagugg cucugccugc ugagccccag 12960  
ugggccuguc ugcaaccugc ccaaugggaa gggcugggac aacggcacaau gcgugccugu 13020  
gcccucucca agccccccc cagaugcucc cggccugga accuguaacc ugcagugcuu 13080  
caacgguggc agcuguuucc ucaaugcacg gaggcagccc aagugccgcu gccaacccccg 13140  
cuacacgggu gacaagugug aacuggacca gugcugggag cacugucgca augggggcac 13200  
cugugcugcc uccccucug gcaugcccac gugccggugc cccacgggcu ucacgggccc 13260

ES 2 765 573 T3

caaaugcacc cagcaggugu gugcgggcuu cugugccaac aacagcaccu gcacugucuaa 13320  
 ccagggcaac cagccccagu gccgaugccu acccggcuuc cuggggcgacc gcugccagua 13380  
 ccggcagugc ucugggcuacu gugagaacuu uggcacaugc cagauggcug cugauggcuc 13440  
 ccgacaaugc cgcugcacug ccuacuuga gggaucgagg ugugagguga acaaugcag 13500  
 ccgcugucuc gaaggggccu guguggucaa caagcagagu ggggauguca ccugcaacug 13560  
 cacggauggc cggguggccc ccagcugucu gaccugcguc ggccacugca gcaauggcgg 13620  
 cuccuguacc augaacagca aaaugaugcc ugagugccag ugccccccc acaugacagg 13680  
 gccccggugu gaggagcacg ucuucagcca gcagcagcca ggacauauag ccuccauccu 13740  
 aaucccucug cuguugcugc ugcugcuggu ucugguggcc ggagugguau ucugguauaa 13800  
 gcggcgaguc caaggggcuu agggcuucca gcaccaacgg augaccaacg gggccaugaa 13860  
 cguggagauu ggaaacccca ccuacaagau guacgaaggc ggagagccug augauguggg 13920  
 aggccuacug gacgcugacu uugcccugga ccugacaag cccaccaacu ucaccaaccc 13980  
 cguguaugcc acacucuaca uggggggcca uggcagucgc cacucccugg ccagcacgga 14040  
 cgagaagcga gaacuccugg gccggggccc ugaggacgag auaggggacc ccuuggcaua 14100  
 gggcccugcc ccgucggacu gccccagaa agccuccugc ccccugccgg ugaaguccuu 14160  
 cagugagccc cuccccagcc agcccuuccc uggccccgcc ggauguauaa auguaaaaau 14220  
 gaaggaauua cauuuuauau gugagcgagc aagccggcaa gcgagcacag uauuuuuuc 14280  
 ccauccccuc ccugccugcu ccuuggcacc cccaugcugc cuucagggag acagggcagg 14340  
 agggcuuggg gcugcaccuc cuaccuccc accagaacgc accccacugg gagagcuggu 14400  
 ggugcagccu uccccuccu guauaagaca cuuugccaag gcucuccccu cucgccccau 14460  
 cccugcuugc ccgcuccac agcuuccuga gggcuauuuc ugggaagggg gaguucuuug 14520  
 cugccccugu cuggaagacg uggcucuggg ugagguaggc gggaaaggau ggaguguuuu 14580  
 aguucuuuggg ggaggccacc ccaaacccca gcccacacuc caggggcacc uaugagaugg 14640  
 ccaugcucaa cccccuccc agacaggccc ucccugucuc cagggcccc accgagguuc 14700  
 ccagggcugg agacuuccuc ugguaaacau uccuccagcc uccccuccc uggggacgcc 14760  
 aaggaggugg gccacacca ggaagggaaa gcgggcagcc ccguuuuggg gacgugaacc 14820  
 uuuuaauaa uuuugcugaa uuuccuuaca acuaaaauac acagauauug uuauaaaaua 14880  
 aaauguaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 14905

<210> 10  
 <211> 4544  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 765 573 T3

<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



ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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					

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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			

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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				

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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				

ES 2 765 573 T3

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 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

ES 2 765 573 T3

<210> 11  
 <211> 7783  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgccagc cugagcccgc cccgccgccg 60  
 agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcgggcggc 120  
 gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgcccgggc aaggacucgg agggcugaga 180  
 cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug 240  
 ggcucccccg agccggggcc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug 300  
 cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa 360  
 gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucucc 420  
 ucugugugga gaugcgcgga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgcgga ggacgcugc 480  
 cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa 540  
 cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu 600  
 ugcaccaagc aggugugucc ugcagagaag cugagcugug gaccaccag ccacaagugu 660  
 guaccugccu cguggcgcug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720  
 ggcugugcua ccuugugcgc cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc 780  
 gccguguucg ugugcgcgag cgacgcgac uguggugacg gcagcgauga gcgcggcugu 840  
 gcagaccccg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcggcg gcgauggcgg cggcgcucg 900  
 aucccgagc gcugggucug cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca 960  
 gccgagcucu gcggccgucc gggccccggg gccacguccg cccccgccg cugcgccacc 1020  
 gccucccagu ucgccugccg cagcggcgag ugcgugcacc ugggcuggcg cugcgacggc 1080  
 gaccgcgacu gcaaagacaa aucggacgag gccgacugcc cacugggcac cugccguggg 1140  
 gacgaguucc agugugggga ugggacaugu guccuugcaa ucaagcacug caaccaggag 1200  
 caggacuguc cagaugggag ugaugaagcu ggcugccuac aggggcugaa cgagugucug 1260  
 cacaacaauug gcgcgcugc acacaucugc acugaccuca agauuggcuu ugaaugcagc 1320  
 ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag 1380  
 gaccagaug ccugcagcca gaucuguguc aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc 1440  
 uaccucggcu acgagaugga ccuacugacc aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc 1500  
 ccuucccuaa ucuucaccaa ccggcacgag gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac 1560  
 uauucacgcc ucauucccau gcucaagaau gucguggcac uagaugugga aguugccacc 1620  
 aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac cguaagaucu auagcgcua cauggacaag 1680

ES 2 765 573 T3

gccagugacc	cgaaagagca	ggagguccuc	auugacgagc	aguugcacuc	uccagagggc	1740
cuggcagugg	acugggucca	caagcacauc	uacuggacug	acucgggcaa	uaagaccauc	1800
ucaguggcca	caguugaugg	uggccgccga	cgcacucucu	ucagccguaa	ccucagugaa	1860
ccccgggcca	ucgcuguuga	ccccucgca	ggguucaugu	auuggucuga	cuggggggac	1920
caggccaaga	uugagaaauc	ugggcucaac	gguguggacc	ggcaaacacu	ggugucagac	1980
aaauugaau	ggccaacgg	aaucaccucg	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	uagugucucc	agggcuccca	gcaucagccc	gucuaccucca	2640
agcccugcaa	ccagcaacca	cucccagcac	uaugcaaaug	aagacaguua	gaugggcuca	2700
acagucacug	ccgcuguuau	cgggaucauc	gugcccrauag	uggugauagc	ccuccugugc	2760
augaguggau	accugaucug	gagaaacugg	aagcgggaaga	acaccaaaaag	caugaauuuu	2820
gacaaccag	ucuaacaggaa	aacaacagaa	gaagaagacg	aagaugagcu	ccauauaggg	2880
agaacugcuc	agaauggcca	ugucuauccu	gcagcaauca	gcagcuuuga	ucgcccacug	2940
ugggcagagc	ccugucuugg	ggagaccaga	gaaccggaag	accagcccc	ugcccucaag	3000
gagcuuuuug	ucuugccggg	ggaaccaagg	ucacagcugc	accaacuccc	gaagaaccuu	3060
cuuuccgagc	ugccugucgu	caaauccaag	cgaguggcau	uaagccuuga	agaugaugga	3120
cuaccugag	gaugggauca	ccccuucgu	gccucaugga	auucaguccc	augcacuaca	3180
cucuggaugg	uguaugacug	gaugaauugg	uuucuauaua	ugggucugug	ugaguguaug	3240
ugugugugug	auuuuuuuuu	uaauuuuau	uugcggaaag	guaaccacaa	aguuaugaug	3300
aacugcaaac	auccaaagga	ugugagaguu	uuucuaugua	uaauguuuuu	uacacuuuuu	3360
aacugguugc	acuaccaug	aggaauucgu	ggaauggcua	cugcugacua	acaugaugca	3420
cauaaccaa	ugggggcca	uggcacagua	ccuacucau	cauuuaaaaa	cuauuuuac	3480
agaagauguu	ugguugcugg	gggggcuuuu	uuagguuuug	gggcuuuugu	uuuuuguaaa	3540
uaagaugauu	augcuuugug	gcuauccauc	aacauaagua	aaaaaaaaaa	aaaaacacuu	3600

ES 2 765 573 T3

caacuccuc	ccccauuag	auuauuuuu	aacauuuuu	aaaaaucaga	ugaguucua	3660
aaauuuuu	gagaagugag	aguauuuuu	uuuggcaugu	uuggcccacc	acacagacuc	3720
ugugugugua	uguguguguu	uauaugugua	ugugugugac	agaaaaaucu	guagagaaga	3780
ggcacauca	uggcuacugu	ucaaauacau	aaagauaaa	uuuuuuucac	acaguccaca	3840
agggguauau	cuuguaguuu	ucagaaaagc	cuuuggaaa	cuggaucaga	aaauagauac	3900
caugguuugu	gcauuuangu	aguaaaaaag	gcaaaucuuu	ucaccucugg	cuauuccuga	3960
gaccccagga	agucaggaaa	agccuuucag	cucacccaug	gcugcuguga	cuccuaccag	4020
ggcuuuucug	gcuuuggcga	aggucagugu	acagacauuc	caugguacca	gagugcucag	4080
aaacucaaga	uaggauaugc	cucaccuca	gcuacucuu	guuuuaaagu	ucagcucuuu	4140
gaguaacuuc	uucauuucu	uucaggacac	uuggguugaa	uucaguaagu	uuccucugaa	4200
gcaccugaa	gggugccauc	cuuacagagc	uaaguggaga	cguuuccaga	ucagccaag	4260
uuuacuauag	agacuggccc	aggcacugaa	ugucuaggac	augcugugga	ugaagauaaa	4320
gaugguggaa	uagguuuuau	cacaucucuu	auuucucuuu	uccccuuacu	cucuaccuu	4380
uccuuuangu	ggggaaacau	uuuaagguaa	uaaaauaggu	acuuaccauc	auauguucuu	4440
auagaugaaa	cuaauuuuug	gcuuaaguca	gaacaacugg	ccaaaauuga	agucuuuuu	4500
gaggggggaa	auggcuaucg	cauuuuuuu	uuuuuuugga	uuuuuuguu	cacacaggaa	4560
uuugguuuac	ugcuuuguaa	auaaaaggaa	aaacuccggg	uauauguaa	gauguucuu	4620
auuauagaca	ucuucuuugc	uuuucuuugg	cuugggggag	gaaggagaa	gugcucuuuu	4680
cuacuugugg	ggucucccau	uggaaacaua	auccuauagu	cccagaagga	uucagucucc	4740
aguggcuuuc	ccauccaaag	agaaagaguu	ugaguuuucu	aacucugcug	uucugccacu	4800
uacucccacu	agacaaccag	ggacaaggug	caacauagg	guguuugacu	uaaguaggag	4860
cagaggagcu	gcaucuaauc	ucaucauacc	uggaacuuga	cacacuuuag	caauugccuu	4920
cccauccua	ccugccagau	gcccccaacu	caaugaaguu	ggaugucuca	ccagcuugau	4980
acccuuugaa	uuuucaguca	gacauucugg	aguucuaagc	uccuguaccu	aggaccuucc	5040
ucugugucac	ucuuggccuc	cuaaacucua	agaaaauaac	uauuuucugg	agcuugggca	5100
guguguuuug	cauaauccag	caaucuccuc	augacaugca	uguguugaua	guccugaaac	5160
auucauugag	aggguaaaug	caguugaccu	agaauagcca	auaccaaaca	gaauuuuag	5220
aacagguggc	caaucuccau	ggagcuuacu	cacauuuuac	uauuuuuua	agaacggaaa	5280
guaaaauuau	uuuugacuga	agaaaaauga	ugacagugaa	aaacauagg	auguacucua	5340
acaagugac	uuuuucugua	accuuccaaa	gaaacugaau	uuuccaagga	auuuuauug	5400
aacaguggcu	aaggcauagu	uucuaaacuu	ucaguaagau	ccuggcauuc	acagaaaaaa	5460

ES 2 765 573 T3

augaugaauug gggucuggac auacagccug agaucucaaa augacaauga aaucacaac 5520  
 uuuuucucag agacauucau guuuccugca uaugcuacaa cugcaguug aaagaggcag 5580  
 caaugggagc aaccuuuuac aagaaacaaa uugugauua uucauguguu ggacggcagu 5640  
 aaauaagaug aaaccugagg agucagaucc accuucCCCC auucauagag gcuuuucagc 5700  
 cucuuuuuga gguacaguuu cauauuuuu gccuuuugcc cccgugcaua gcuaucuaca 5760  
 gccaaucaca gaucacagag ucacuggacu auagagcugg aaggaagcuc agagacaauug 5820  
 ccaagggggc agaaaauuua ucagaagcca gucccagugc guuuccucca uuuccuucug 5880  
 caggaagacu auuuugggcu gccugaacau uguaucaaac cugcuaccua uacuauugguc 5940  
 uaccuuuccu ccaguggaau uacaaaggca cuaacugaaa ugccuucuaug aaacagagaa 6000  
 aacgaaacug uacuuauuua cucuugauac acagauuuuu uauaaaacag auugaaguua 6060  
 ccuguuuacu ggcaaaaaga gaugagauc ggauuuuuuu guauggcagu aaguccuauu 6120  
 gauccucca guuauucucag uaugacugca guauuuucau ucacuuuuac cacucacuag 6180  
 auaccaacua cacaccuggc acugcagaug uaaaggucag ucacacaugu ucugacuuaa 6240  
 cagaguucac aguagcagug gaggaugaua uauguggaaa caaaaaaggc auugauucua 6300  
 uucagagcac uguuagggcu caaaggagag aggggucuuu ccaccuaaga aaugaggaau 6360  
 agggucauca uagaagugac cuuaagucuu aaaaauuuag aaggggauuc caagcugcuu 6420  
 cagacagaga cacaucgagc uaaaacacag agguaugaaa gagcacaggg acuuuagga 6480  
 uugcacaguu cauucuaaca ggaacaaaag gcucaagggg ggcaagaaau gaggcuguau 6540  
 ggaaagagau ucaauguuag cacuuuuuuu aaauaguuuu uuucugauuc aaugaagcau 6600  
 uuucugauca uuuguuuacaa ggcacuacau gcaucaugga aaauucauuu ggauugcauug 6660  
 ccagcacuuu gcagaacuga uuuuuuuuag ccucaagcuu uccaguggcc aaagggaaaau 6720  
 gcugacugcu uuucuuuuuu uuugaucaaa guuuuuuuuu auuggucaaug aagacuuaa 6780  
 uaagggcagu gggauuuuca cagaugcaug ccauguuguc gagagccucu uagauuuucu 6840  
 caacugugag aaagaaaaac gaaaauuuug aagacguuga gucuggagag gggauacuaa 6900  
 ucacugucca guugggcacu ggugggaaug gggaaauggc acaggaaugc aagccucucc 6960  
 acccuacccc ccgaacucca gccauacacu caucguuuca caaaaauuuu auagauuagc 7020  
 auuuuuuuuu ucagaguuaa uaaauccuuu ucccgaauug caugaagaua gaguaacaga 7080  
 cuucucacac uguuuuuuuu ggguauggag auuuuagaag guuuuuuuuu uacugcuuca 7140  
 auuuuuucagu uaaaaaaaaa ucaggaagcu cuguucauuc aggcuaugca ccaugugcac 7200  
 agucaagaau uagcagaaac ccucugcauu uacaaacacu uuugucuaaa aaaaaguuaa 7260  
 uuuuuuuuuu ccacgugugu guguguguuu auuuuuuuuu auuuuuuuuu uuuuuuuuuu 7320  
 gguuuuuuuu cuuuuuuuuu aaaaacuaaa gagaaaacaa auuuuuuuuu ccaaaccaua 7380

ES 2 765 573 T3

uacuuuuaaa agagcauuuu uuuuuccaau caagcuguug uuaauuuggg gguaaagugc 7440  
 ugauuugcaa acuucaucaa auuguuccca aguggauucu ccuuguuugu ccccccuac 7500  
 caccccaaa guuaccauau uugauguaag aaucaggcau guuagaaugu ugugucacac 7560  
 uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau ucaaguuccg uuagcuucug uacgcggugc 7620  
 ccuuugcagu cuggugucuc uuccagaggc gagggggcug aggauggggg gcugcaucuc 7680  
 acuagcuaua cuggcaucau cuugguaaac ugaaaaccaa auguggacau uuguaaaauc 7740  
 agugcacugu uucuagagag agauuuuuuu cauuuuuuuu 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

Gly Leu Pro

<210> 13  
 <211> 7273  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 gcuggcggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgcccggc 60  
 agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg gccggggcggc agcggcggcg 120  
 gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccc gcgcccgcgcc aaggacucgg agggcugaga 180  
 cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgccaug 240  
 ggccuccccc agccgggccc ucuccggcuu cuggcgcuvc ugcugcuvcu gcugcuvcu 300  
 cugcuvcuvc agcuccagca ucuugcgcg gcagcgcuvc auccgcugcu cggcggccaa 360  
 gggcccggcca aggauugcga aaaggaccaa uccagugcc ggaacgagcg cugcaucucc 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 cugagcuvcu gaccaccag ccacaagugu 660  
 guaccugccu cguggcgcuvc cgacggggag aaggacucgc aggguggagc ggauagggcc 720  
 ggcugugcuu ccuggcugaa cgagugucug cacaacaauvc gcggcuvcuc acacaucugc 780  
 acugaccuca agauuggcuu ugaauvcagc ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag 840  
 aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag gaccagauvc ccugcagcca gaucuguguc 900  
 aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc uaccucggcu acgagaugga ccuacugacc 960  
 aagaacugca aggcugcuvc uggcaagagc ccaucccuua ucuucaccaa ccggcacgag 1020  
 gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac uauucacgcc ucauccccau gcucaagaau 1080  
 gucguggcac uagaugugga aguugccacc aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac 1140  
 cguaagauvc auagcgccua cauggacaag gccagugacc cgaaagagca ggagguccuc 1200  
 auugacgagc aguugcacuc uccagagggc cuggcagugc acugggucca caagcacauvc 1260

ES 2 765 573 T3

uacuggacug	acucgggcaa	uaagaccauc	ucaguggcca	caguugaugg	uggccgccga	1320
cgcacucucu	ucagccguaa	ccucagugaa	ccccgggcca	ucgcuguuga	ccccucgcga	1380
ggguucaugu	auuggucuga	cugggggggac	caggccaaga	uugagaaauc	ugggcucaac	1440
gguguggacc	ggcaaacacu	ggugucagac	aaauuugaau	ggcccaacgg	aaucacccug	1500
gaucugcuga	gccagcgcuu	guacugggua	gacuccaagc	uacaccaacu	guccagcauu	1560
gacuucagug	gaggcaacag	aaagacgcug	aucuccucca	cugacuuccu	gagccacccu	1620
uuugggauag	cuguguuuga	ggacaaggug	uucuggacag	accuggagaa	cgaggccaau	1680
uucagugcaa	aucggcucaa	uggccuggaa	aucuccaucc	uggcugagaa	ccucaacaac	1740
ccacaugaca	uugucaucuu	ccaugagcug	aagcagccaa	gagcuccaga	ugccugugag	1800
cugagugucc	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	uagugucccc	2100
agggcuccca	gcaucagccc	gucuaccgua	agcccugcaa	ccagcaacca	cucccagcac	2160
uaugcaaaug	aagacaguua	gaugggcuca	acagucacug	ccgcuguuau	cgggaucauc	2220
gugcccauag	uggugauagc	ccuccugugc	augaguggau	accugaucug	gagaaacugg	2280
aagcgggaaga	acaccaaaag	caugaauuuu	gacaaccccag	ucuaacaggaa	acaacagaa	2340
gaagaagacg	aagaugagcu	ccauauaggg	agaacugcuc	agauuggcca	ugucuauccu	2400
gcagcaauca	gcagcuuuga	ucgcccacug	ugggcagagc	ccugucuugg	ggagaccaga	2460
gaaccggaag	accagcccc	ugcccucaag	gagcuuuuug	ucuuugccggg	ggaaccaagg	2520
ucacagcugc	accaacuccc	gaagaacccu	cuuuccgagc	ugccugucgu	caaauccaag	2580
cgaguggcau	uaagccuuga	agaugaugga	cuaccucgag	gaugggauca	ccccuucgu	2640
gccucaugga	auucaguccc	augcacuaca	cucuggaugg	uguauzacug	gaugaauugg	2700
uuucuauaia	ugggucugug	ugaguguaug	ugugugugug	auuuuuuuuu	uaaaauuaug	2760
uugcggaaag	guaaccacaa	aguuaugaug	aacugcaaac	auccaaagga	ugugagaguu	2820
uuucuaugua	uaauguuuuu	uacacuuuuu	aacugguugc	acuacccaug	aggaauucgu	2880
ggaauggcua	cugcugacua	acaugaugca	cauaacccaa	ugggggccaa	uggcacagua	2940
ccuuacucau	cauuuaaaaa	cuauuuuuac	agaagauguu	ugguugcugg	gggggcuuuu	3000
uuagguuuug	gggcauuugu	uuuuuguaaa	uaagaugauu	augcuuugug	gcuauccauc	3060
aacauaagua	aaaaaaaaaa	aaaaacacuu	caacucccuc	ccccauuuag	auuauuuuuu	3120
aacauuuuuu	aaaaaucaga	ugaguucuaa	aaauuuuuu	gagaagugag	aguauuuuuu	3180

ES 2 765 573 T3

uuuggcaugu uuiggcccacc acacagacuc ugugugugua uguguguguu uauaugugua 3240  
ugugugugac agaaaaaucu guagagaaga ggcacaucua uggcuacugu ucaaaauacau 3300  
aaagauaaa uuuuuucac acaguccaca agggguauau cuuguaguu ucagaaaagc 3360  
cuuuggaaa cuuggaucaga aaauagauac caugguuugu gcauuuau guaaaaaag 3420  
gcaaaucuu ucaccucugg cuauuccuga gaccccagga agucaggaaa agccuuucag 3480  
cucacccaug gcugcuguga cuccuaccag ggcuuuucug gcuuuggcga aggucagugu 3540  
acagacauuc caugguacca gagugcucag aaacucaaga uaggauaugc cucaccucua 3600  
gcuacuccuu guuuuaaagu ucagcucuu gaguaacuuc ucaaauuuc uucaggacac 3660  
uuggguugaa uucaguaagu uuccucugaa gcaccucugaa gggugccauc cuuacagagc 3720  
uaaguggaga cguuuccaga ucagcccag uuuacuauag agacuggccc aggcacugaa 3780  
ugucuaggac augcugugga ugaagauaaa gaugguggaa uagguuuuau cacaucucuu 3840  
auuucucuu uccccuuacu cucuaccuu uccuuuau guggaaacau uuuaagguaa 3900  
uaaaauaggu acuuaccauc auauguucuu auagaugaaa cuauuuuuug gcuuuaguc 3960  
gaacaacugg ccaaaaauuga agucuuuuu gaggggggaa auggcuuacg cauuuuuua 4020  
uuuuuuugga uuuuuuuguu cacacaggaa uuugguuuac ugcuuuugua auaaaaggaa 4080  
aaacuccggg uauauguua gauguucuu auuuuagaca ucuucuuugc uuuucuuuggc 4140  
cuugggggag gaaggagaa gugcucuuuu cuacuugugg ggucucccau uggaaacaua 4200  
auccuuuagu cccagaagga uucagucucc aguggcuuu ccauccaaag agaaagaguu 4260  
ugaguuuuu aacucugcug uucugccacu uacucccacu agacaaccag ggacaaggug 4320  
caacauggaa guguuugacu uaaguaggag cagaggagcu gcaucuaa ucaucauacc 4380  
uggaacuuga cacacuuaag caaaugccuu cccaucccau ccugccagau gcccccaacu 4440  
caaugaaguu ggaugucua ccagcuugau acccuuugaa uuuucaguc gacuuucugg 4500  
aguucagca uccuguaacc aggaccuucc ucugugucac ucuuggccuc cuaaacucua 4560  
agaaaaaac uauuuucugg agcuugggca guguguuuu cauaauccag caaucuccuc 4620  
augacaugca uguguugua guccugaaac auucauugag aggguaaaug caguugaccu 4680  
agaugacca auaccaaaca gaauuuuaag aacagguggc caacuccuau ggagcuuacu 4740  
cacauuuuac uauuuuuua agaacggaaa guaaaauuu uuuugacuga agaaaaauga 4800  
ugacagugaa aaacauggaa auguacuaa aacaagugac uuuuuucugua accuuccaaa 4860  
gaaacugaau uuuccaagga auuaaaugau aacaguggcu aaggcauagu uucuaaacuu 4920  
ucaguaagau ccuggcauuc acagaaaaaa augaugaaug gggucuggac auacagccug 4980  
agaucuaaa augacauga aaucacaac uuuuucucag agacauucuu guuuccugca 5040

ES 2 765 573 T3

uaugcuacaa cugcaguuuug aaagaggcag caaugggagc aaccuuuac aagaaacaaa 5100  
 uugugauaua uucauguguu ggacggcagu aaauaagaug aaaccugagg agucagaucc 5160  
 accuuccccc auucauagag gcuuuucagc cucuuuuuga gguacaguuu cauauuuuuu 5220  
 gccuuuugcc cccgugcaua gcuaucuaa gccaaucaca gaucacagag ucacuggacu 5280  
 auagagcugg aaggaagcuc agagacaauug ccaagggggc agaaaauuua ucagaagcca 5340  
 gucccagugc guuuccucca uuuccuucug caggaagacu auuuugggcu gccugaacau 5400  
 uguaucaaac cugcuaccua uacuaugguc uaccuuuccu ccaguggaau uacaaaggca 5460  
 cuaacugaaa ugccuucuaag aaacagagaa aacgaaacug uacuuuuua cucuugauac 5520  
 acagauuuuu uauaaaacag auugaaguaa ccuguuuacu ggcaaaaaga gaaugagauc 5580  
 ggauuuuuuu guauggcagu aaguccuauu gauccucca guuauucucag uaugacugca 5640  
 guauauucau ucacuaaaac cacucacuag auaccaacua cacaccuggc acugcagaug 5700  
 uaaaggucag ucacacaugu ucugacuuaa cagaguucac aguagcagug gaggaugaua 5760  
 uauguggaaa caaaaaaggc auugauucua uucagagcac uguuugggcu caaaggagag 5820  
 aggggucuuu ccaccuaaga aaugaggaau agggucaua uagaagugac cuuaagucuu 5880  
 aaaaauuuag aaggggauuc caagcugcuu cagacagaga cacaucgagc uaaaacacag 5940  
 agguaugaaa gagcacaggg acuuuaggaa uugcacaguu cauucuaaca ggaacaaaag 6000  
 gcucaagggg ggcaagaaau gaggcugua uggaaagagau ucaauguaag cacuuuuuaa 6060  
 auuagauuaa uuucugauuc aaugaagcau uuucugauca uuguguacaa ggcacuacau 6120  
 gcaucaugga aaauucauaa ggauucauug ccagcacuuu gcagaacuga uuuuuuucag 6180  
 ccucaagcuu uccaguggcc aaagggaaau gcugacugcu uuucuuuuu uugagucaaa 6240  
 gauuuuuuuu auggucaaug aagacuaaua uaagggcagu gggauuuuca cagaugcaug 6300  
 ccauguuguc gagagccucu uagauuuucu caacugugag aaagaaaaac gaaaauugug 6360  
 aagacguuga gucuggagag gggauacuaa ucacugucca guugggcacu ggugggaug 6420  
 gggaauggc acaggaauuc aagccucucc acccuacccc ccgaacucca gccauacacu 6480  
 caucguuuca caaaaauuaa augaguuagc auuuuuuuu ucagaguaaa uaaauccuuu 6540  
 ucccgaauug caugaagaua gaguaacaga cuucucacac uguuuuuuuu ggguauggag 6600  
 auuuuagaag guuaaagaau uacugcuuca auuuuucagu uaaaaaaaaa ucaggaagcu 6660  
 cuguucauuc aggcuaugca ccaugugcac agucaagaau uagcagaaac ccucugcauu 6720  
 uacaaacacu uugugcuaua aaaaaguuuu uuuuuuuuu ccacgugugu gugugugua 6780  
 auauauuuu auauauuuu uuuaagccaa gguuuuguaa cuuuuuuaca aaaacuacaa 6840  
 gagaaaacaa auauaccugu ccaaaccuaa uacuuuuuuu agagcauuuu uuuuuuccua 6900  
 caagcuguug uuuuuuuggg gguuaagugc ugauuuugca acuuucaua auuguucca 6960

ES 2 765 573 T3

aguggauucu ccuuguuugu cucccccuac caaccceaaa guaccacauu uugauguaag 7020  
 aaucaggcau guuagaaugu ugugucacac uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau 7080  
 ucaaguuccg uuagcuucug uacgcguguc ccuugcagu cuggugucuc uuccagaggc 7140  
 gagggggcug aggauggggg gcugcaucuc acuagcuaua cuggcaucau cuugguaaac 7200  
 ugaaaaccaa auguggacau uuguaaaauc agugcacugu uucuagagag agauuaaaau 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

	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						

ES 2 765 573 T3

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 cgcgccccagc cugagcccgc cccgcccgcg 60  
agcguccaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg gccgggcggc agcggcggcg 120  
gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga 180  
cgcggcggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcggcc ggagccccgg gcccgcceaug 240  
ggccuccccg agccggggcc ucuccggcuu cuggcgcugc ugcugcugcu gcugcugcug 300  
cugcugcugc agcuccagca ucuugcggcg gcagcggcug auccgcugcu cggcggccaa 360  
gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uuccagugcc ggaacgagcg cugcaucucc 420  
ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc 480  
cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa 540  
cgguggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu 600  
ugcaccaagc aggugugucc ugcaagagaag cugagcugug gaccaccag ccacaagugu 660  
guaccugccu cguggcgcug gcacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720  
ggcugugcua ccucacuggg caccugccgu ggggacgagu uccagugugg ggaugggaca 780

ES 2 765 573 T3

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	ugcuaccucg	gcuacgagau	ggaccuacug	1080
accaagaacu	gcaaggcugc	ugcuggcaag	agcccauucc	uaaucuucac	caaccggcac	1140
gaggugcgga	ggaucgaccu	ggugaagcgg	aacuaauucac	gccucauucc	caugcucaag	1200
aaugucgugg	cacuagaugu	ggaaguugcc	accaauucga	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	gaacccccgg	ccaucgcugu	ugacccccug	1500
cgagggguuca	uguauugguc	ugacuggggg	gaccaggcca	agauugagaa	aucugggcuc	1560
aacggugugg	accggcaaac	acugguguca	gacaauauug	aauggcccaa	cggaaucacc	1620
cuggaucugc	ugagccagcg	cuuguacugg	guagacucca	agcuacacca	acuguccagc	1680
auugacuucca	guggaggcaa	cagaaagacg	cugaucuccu	ccacugacuu	ccugagccac	1740
ccuuuuggga	uagcuguguu	ugaggacaag	guguucugga	cagaccugga	gaacgaggcc	1800
auuuucagug	caaaucggcu	caauggccug	gaaaucucca	uccuggcuga	gaaccucaac	1860
aaaccacaug	acauugucau	cuuccaugag	cugaagcagc	caagagcucc	agaugccugu	1920
gagcugagug	uccagccuaa	uggaggcugu	gaaauaccugu	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	accaaagca	ugaauuuuga	caaccaguc	2220
uacaggaaaa	caacagaaga	agaagacgaa	gaugagcucc	auauagggag	aacugcucag	2280
auuggccaug	ucuauccugc	acgaguggca	uuuagccuug	aagaugaugg	acuaccucga	2340
ggauggggauc	acccccuucg	ugccucaugg	aaucagucc	caugcacuac	acucuggaug	2400
guguaugacu	ggaugaauug	guuucuauiu	augggucugu	gugagugua	gugugugugu	2460
gauuuuuuuu	uuuuuuuuu	guugcgaaa	gguaaccaca	aaguuuugau	gaacugcaaa	2520
cauccaaagg	augugagagu	uuuucuaugu	auaauguuuu	auacacuuuu	uaacugguug	2580
cacuacccau	gaggaauucg	uggaauggcu	acugcugacu	aacaugaugc	acauaaccaa	2640

ES 2 765 573 T3

augggggcca	auggcacagu	accuuacuca	ucauuuaaaa	acuauuuua	cagaagaugu	2700
uugguugcug	ggggggcuuu	uuuagguuuu	ggggcauuug	uuuuuuuguaa	auaagaugau	2760
uaugcuuugu	ggcuauccau	caacauaagu	aaaaaaaaaa	aaaaaacacu	ucaacucccu	2820
cccccauuua	gauuauuuau	uaacauuuu	uaaaaaucag	augaguucua	uaaauuuuu	2880
agagaaguga	gaguauuuau	uuuuggcaug	uuuuggcccac	cacacagacu	cugugugugu	2940
augugugugu	uuauaugugu	auguguguga	cagaaaaauc	uguagagaag	aggcacaucu	3000
auggcucacug	uucaaaauca	uaaagauaaa	uuuauuuuca	cacaguccac	aagggguaua	3060
ucuuguagu	uucagaaaag	ccuuuggaaa	ucuggaucag	aaaauagaua	ccaugguuug	3120
ugcaauuaug	uaguaaaaaa	ggcaaaucuu	uucaccucug	gcuauuccug	agaccccagg	3180
aagucaggaa	aagccuuuca	gcucacccau	ggcugcugug	acuccuacca	gggcuuuuu	3240
ggcuuuggcg	aaggucagug	uacagacauu	ccaugguacc	agagugcuca	gaaacucaag	3300
auaggauaug	ccucaccccuc	agcuacuccu	uguuuuuaag	uucagcucu	ugaguaacuu	3360
cuucaauuuc	uuucaggaca	cuuggguuga	auucaguaag	uuuccucuga	agcaccucga	3420
agggugccau	ccuuacagag	cuaaguggag	acguuuccag	aucagcccaa	guuuacuaua	3480
gagacuggcc	caggcacuga	augucuagga	caugcugugg	augaagauaa	agauggugga	3540
auagguuuua	ucacaucucu	uauuucucu	uuccccuuac	ucucuaccu	uuccuuuaug	3600
uggggaaaca	uuuuuaggua	auaaaauaggu	uacuuaccu	cauauuguca	uauagaugaa	3660
acuaauuuuu	ggcuuaaguc	agaacaacug	gccaaaauug	aagucauauu	ugagggggga	3720
aauggcauac	gcaauuuau	auuauauugg	auuuuuuugu	ucacacagga	auuugguuua	3780
cugcuuugua	aauaaaagga	aaaacuccgg	guauauguau	agauguucu	cauuauagac	3840
aucuucuuug	cuuuucuuug	ccuuggggga	ggaagggaga	agugcucuu	ucuacuugug	3900
gggucuccca	uuggaaacau	aauccuauag	ucccagaagg	auucaguccc	caguggcuuu	3960
cccuaucaaa	gagaaagagu	uugaguuuuc	uaacucugcu	guucugccac	uuacucccac	4020
uagacaacca	gggacaaggu	gcaacaugga	aguguuugac	uuuaguuaga	gcagaggagc	4080
ugcaucuaau	cucaucauac	cuggaacuug	acacacuuua	gcaauugccu	ucccaucccu	4140
accugccaga	ugcccccaac	ucaauugaagu	uggaugucuc	accagcuuga	uaccuuuga	4200
auuuucaguc	agacauucug	gaguucuaagc	auccuguacc	uaggaccuuc	cucuguguca	4260
cucuuggccu	ccuaaacucu	aagaaaauaa	cuauauucug	gagcuugggc	aguguguuuu	4320
gcauaaucca	gcaaucuccu	caugacaugc	auguguugau	aguuccugaaa	cauucuuuga	4380
gaggguaaa	gcaguugacc	uagaauagacc	aauaccaaac	agaauuuuaa	gaacaggugg	4440
ccaacuccua	uggagcuuac	ucacauuuua	cuauucuuuu	aagaacggaa	aguaaaauu	4500
uuuuugacug	aagaaaaaug	augacaguga	aaaacaugga	aauguacuca	aaacaaguga	4560

ES 2 765 573 T3

cuuuuucugu aaccuuccaa agaaacugaa uuuuccaagg aauuaaauga uaacaguggc 4620  
 uaaggcauag uuucuaaaacu uucaguaaga uccuggcauu cacagaaaaa aaugaugaau 4680  
 ggggucugga cauacagccu gagaucucaa aaugacaauug aaauucacaa cuuuuucuca 4740  
 gagacauuca uguuuccugc auaugcuaca acugcaguuu gaaagaggca gcaaugggag 4800  
 caaccuuua caagaaacaa auugugauau auucaugugu uggacggcag uaaaauagau 4860  
 gaaaccugag gagucagauc caccuucucc cauucouaga ggcuuuucag ccucauuuug 4920  
 agguacaguu acauaucuuu ugccuuuugc ccccgugcau agcuaucuac agccaaucc 4980  
 agaucacaga gucacuggac uauagagcug gaaggaagcu cagagacaau gccaaagggg 5040  
 cagaaaauuu aucagaagcc agucccagug cguuuccucc auuuccuucu gcaggaagac 5100  
 uauuuugggc ugccugaaca uuguaucaaa ccugcuaccu auacuauggu cuaccuuucc 5160  
 uccaguggaa uuacaaaggc acuaacugaa augccuucua gaaacagaga aaacgaaacu 5220  
 guacuuaauu acucuuguaa cacagauuau uuauaaaaca gauugaagua accuguaaac 5280  
 uggcaaaaag agaaugagau cggauuuaaa uguauggcag uaaguccuau ugauccucc 5340  
 aguuaucuca guaugacugc aguauauuca uucacuaaaa ccacucacua gauaccaacu 5400  
 acacaccugg cacugcagau guaaagguca gucacacaug uucugacuuu acagaguuca 5460  
 caguagcagu ggagggaugau auauguggaa acaaaaaagg cauugauucu auucagagca 5520  
 cuguuagggc ucaaaggaga gaggggucuu uccaccuaag aaaugaggaa uagggucauc 5580  
 auagaaguga ccuaagucu uaaaaauuaa gaaggggauu ccaagcugcu ucagacagag 5640  
 acacaucgag cuaaaacaca gagguaugaa agagcacagg gacuuuagga auugcacagu 5700  
 ucauucuaac aggaacaaaa ggcucaaggg gggcaagaaa ugaggcugua uggaaagaga 5760  
 uucaauguaa gcacuuuuaa aaauagauua auuucugauu caaugaagca uuucuuugauc 5820  
 auuguguaca aggcacuaca ugcaucaugg aaaaaucauu aggaugcauu gccagcacuu 5880  
 ugcagaacug auuuuuuca gccucaagcu uuccaguggc caaagggaaa ugcugacugc 5940  
 uuuucauua uuugagucua agauuuuuua uauuggucaau gaagacuaau auuagggcag 6000  
 ugggauuuuc acagaugcau gccauguugu cgagagccuc uuagauuuuc ucaacuguga 6060  
 gaaagaaaaa cgaaaauguu gaagacguug agucuggaga ggggauacua aucacugucc 6120  
 aguugggcac uggugggaau ggggaaaugg cacaggaauug caagccucuc caccuaccc 6180  
 cccgaacucc agccauacac ucaucguuuc acaaaaauua aaugaguuag cauuaaangu 6240  
 uucagaguaa auuuuuuccu uucccgaaau gcaugaagau agaguaacag acuuucacaa 6300  
 cuguauuuuu aggguaugga gaauuuagaa gguaaaagaa uuacugcuuc auuuuuucag 6360  
 uaaaaaaaaa aucaggaagc ucuguucauu caggcuauugc accaugugca cagucaagaa 6420

ES 2 765 573 T3

```

uuagcagaaa cccucugcau uuacaaacac uuugugcuau aaaaaguaa uuuuuaaaaa    6480
gccacgugug ugugugugua uauauauaua uauauauaua uuuaagcca agguuuugau    6540
acuuuuuuac aaaaacuaca agagaaaaca aaauuaccug uccaacccau auacuuuuuaa    6600
aagagcauuu uuuuuuccau acaagcuguu guuaauuugg ggguaaagug cugauuugca    6660
aacuucauca aauguuucc aaguggauuc uccuuguuug ucucuccua ccaaccccaa    6720
aguuaccaua uuugauguaa gaucaggca uguuagaauug uugugucaca cuaacugauu    6780
cugcucuuuu ugucuuuca uucaaguucc guuagcuucu guacgaggug ccuuugcag    6840
ucuggugucu cuuccagagg cgagggggcu gaggaugggg ugucugcaucu cacuagcuau    6900
acuggcauca ucuugguaaa cugaaaacca aauguggaca uuuguaaaau cagugcacug    6960
uuucuagaga gagauuaau 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

```

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

	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 gccgccagg gccggggccg cgcgccagc cugagcccgc cccgccgcc	60
agcguacccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcggggcggc agcggcggcg	120
gcggcggcgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgcccggc aaggacucgg agggcugaga	180
cgcgcgggcg gcggcgggg gagcgcgggg cgcggcgcc ggagccccgg gcccgccaug	240
ggccuccccg agccggggcc ucuccggcu cuggcgugc ugcugugcu gcugugugc	300
cugcugugc agcuccagca ucuugcgcg gcagcgugc 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 gaccaccag ccacaagugu	660
guaccugccu cguggcgug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc	720
ggcugugcua ccuugugcg cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc	780
gccguguucg ugugcgacgg cgacgacgac uguggugacg gcagcgauga gcgcggcugu	840
gcagacccgg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcggcg gcgauggcgg cggcggcugc	900
aucccgagc gcugggucug cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca	960
gccgagcucu gcggccguc gggccccgg gccacgucg cggccggcg cugcgccacc	1020
gccucccagu ucgccugcc cagcggcgag ugcgugcacc ugggcuaggc cugcgacggc	1080
gaccgcgacu gcaaagacaa aucggacgag gccgacugcc cacugggcac cugccguggg	1140
gacgaguucc aguguggga ugggacaugu guccuugcaa ucaagcacug caaccaggag	1200
caggacugc cagaugggag ugaugaagcu ggcugccuac aggggcugaa cgagugucug	1260

ES 2 765 573 T3

cacaacaaug gcggcugcuc acacaucugc acugaccuca agauuggcuu ugaaugcacg 1320  
ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag 1380  
gaccagaug ccugcagcca gaucuguguc aauuacaagg gcuauuuuaa gugugagugc 1440  
uaccucuggcu acgagaugga ccuacugacc aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc 1500  
ccaucuccuaa ucuucaccaa ccggcacgag gugcggagga ucgaccuggu gaagcggaac 1560  
uauucacgcc ucauccccau gcucaagaau gugcuggcac uagaugugga aguugccacc 1620  
aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac cguaagaucu auagcggcua cauggacaag 1680  
gccagugacc cgaaagagca ggagguccuc auugacgagc aguugcacuc uccagagggc 1740  
cuggcagugg acugggucca caagcacauc uacuggacug acucgggcaa uaagaccauc 1800  
ucaguggcca caguugaugg ugcccggcga cgcacucucu ucagccguaa ccucagugaa 1860  
ccccgggcca ucgcuguuga ccccugcga ggguucaugu auuggucuga cuggggggac 1920  
caggccaaga uugagaauc ugggcucaac gguguggacc ggcaaacacu ggugucagac 1980  
aaauugaau ggcccaacgg aaucaccug gaucugcuga gccagcgcuu guacugggua 2040  
gacuccaagc uacaccaacu guccagcauu gacuucagug gaggcaacag aaagacgcug 2100  
aucuccucca cugacuuccu gagccaccu uuugggauag cuguguuuga ggacaaggug 2160  
uucuggacag accuggagaa cgaggccaau uucagugcaa aucggcucaa uggccuggaa 2220  
aucuccaucc uggcugagaa ccucaacaac ccacaugaca uugucaucu 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 aagagcccc 2520  
gggaccaccg uccacagauc caccuaccag aaccacagca cagagacacc aagccugaca 2580  
gcugcagucc caagcucagu uagugucucc agggcuccca gcaucagccc gucuaccua 2640  
agcccugcaa ccagcaacca cucccagcac uaugcaaaug aagacaguaa gaugggcua 2700  
acagucacug ccgcuguuau cgggaucauc gugcccuaug uggugauagc ccuccugugc 2760  
augaguggau accugaucug gagaaacugg aagcggaga acaccaaaag caugaauuu 2820  
gacaaccagc ucuacaggaa aacaacagaa gaagaagacg aagaugagcu ccauauaggg 2880  
agaacugcuc agauuggcca ugucuauccu gcacgagugg cauuagccu ugaagaugau 2940  
ggacuaccu gaggauggga ucaccccuu cgugccucau ggauuucagu ccaugcacu 3000  
acacucugga ugguguauga cuggaugaau ggguuucua auaugggucu gugugagugu 3060  
augugugugu gugauuuuu uuuuaaaau auguugcgga aagguaacca caaaguuaug 3120  
augaacugca aacaucacaa ggaugugaga guuuuucua guauaauuu uuauacacu 3180

ES 2 765 573 T3

uuuaacuggu	ugcacuaccc	augaggaauu	cguggaaugg	cuacugcuga	cuaacaugau	3240
gcacauaacc	aaaugggggc	caauggcaca	guaccuuacu	caucauuuaa	aaacuauauu	3300
uacagaagau	guuuggguug	ugggggggcu	uuuuuagguu	uuggggcauu	uguuuuuugu	3360
aaauaagaug	auuaugcuuu	guggcuaucc	aucaacauaa	guaaaaaaaa	aaaaaaaaaca	3420
cuucaacucc	cucucccauu	uagauuuuuu	auuaacauau	uuuaaaaauc	agaugaguuc	3480
uauaaaauau	uuagagaagu	gagaguauuu	auuuuuuggca	uguuuugccc	accacacaga	3540
cucugugugu	guaugugugu	guuuauaugu	guaugugugu	gacagaaaaa	ucuguagaga	3600
agagggcacu	cuauggcuac	uguucaaaau	cauaaagaua	aauuuuuuuu	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	cuuguuuuua	aguucagcuc	3960
uuugaguaac	uucuucaauu	ucuuucagga	cacuuggguu	gaauucagua	aguuuccucu	4020
gaagcacccu	gaagggugcc	auccuuacag	agcuaagugg	agacguuucc	agaucagccc	4080
aaguuuacua	uagagacugg	cccaggcacu	gaaugucua	gacaugcugu	ggaugaagau	4140
aaagauggug	gaauaggguu	uaucacaucu	cuuauuucuc	uuuuccccc	acucucuacc	4200
auuuccuuua	uguggggaaa	cauuuuuag	uaauaaaau	guuacuuacc	aucauauuu	4260
cauauagaug	aaacuaauuu	uuggcuuaag	ucagaacaac	uggccaaaau	ugaagucua	4320
uuugaggggg	gaaauggcau	acgcaauauu	auauuuauuu	ggauuuuuau	guucacacag	4380
gaauuugguu	uacugcuuug	uaaauuuuu	gaaaaaacucc	ggguauaugu	auagauguuc	4440
uucuuuuuag	acaucuuucuu	ugcuuuuucuu	ggccuugggg	gaggaaggga	gaagugcucu	4500
uuucuaacuug	uggggucucc	cauuggaaac	auaauccuau	agucccagaa	ggauucaguc	4560
cccaguggcu	uucccaucca	aagagaaaga	guuugaguuu	cuuaacucug	cuguucugcc	4620
acuuacuccc	acuagacaac	cagggacaag	gugcaacaug	gaaguguuug	acuuuaguag	4680
gagcagagga	gcugcaucua	aucucaucau	accuggaacu	ugacacacuu	aagcaaaugc	4740
cuucccaucc	cuaccugcca	gaugccccc	acucaaugaa	guuggauguc	ucaccagcuu	4800
gauaccuuuu	gaauuuucag	ucagacauuc	uggaguucua	gcauccugua	ccuaggaccu	4860
uccucugugu	cacucuuggc	cuccuaaaacu	cuaagaaaau	aacuauauuc	uggagcuugg	4920
gcaguguguu	uugcauaauc	cagcaaucuc	cucaugacau	gcauguguu	auaguccuga	4980
aacauucauu	gagaggguaa	augcaguuga	ccuagaauga	ccaauacc	acagaauuuu	5040

ES 2 765 573 T3

aagaacaggu ggccaacucc uauggagcuu acucacauau uacuaucuu uuaagaacgg 5100  
aaaguaaaau uauuuuugac ugaagaaaaa ugaugacagu gaaaaacaug gaaauguacu 5160  
caaaacaagu gacuuuuucu guaaccuucc aaagaaacug aauuuuccaa ggaauuaaa 5220  
gauaacagug gcuaaggcau aguuucuaaa cuuucaguaa gauccuggca uucacagaaa 5280  
aaaaugauga auggggucug gacauacagc cugagaucuc aaaaugacaa ugaaaauccac 5340  
aacuuuuucu cagagacauu cauguuuccu gcuaugcua caacugcagu uugaaagagg 5400  
cagcaauggg agcaaccuu uacaagaaac aaauugugau auauucaugu guuggacggc 5460  
aguaaauaag augaaaccug aggagucaga uccaccuucc cccauucaua gaggcuuuuc 5520  
agccucauuu ugagguacag uuacauaucu uuugccuuuu gcccccgugc auagcuaucu 5580  
acagccaauc acagaucaca gagucacugg acuaugagc uggaaggaag cucagagaca 5640  
augccaaggg ggcagaaaau uuaucaagaag ccagucccag ugcguuuccu ccuuuuccuu 5700  
cugcaggaag acuauuuugg gcugccugaa cauuguauc aaccugcuac cuauacuaug 5760  
gucuaccuuu ccuccagugg aaauacaaag gcacuaacug aaaugccuuc uagaaacaga 5820  
gaaaacgaaa cuguacuua uacucuuuga uacacagauu auuuauaaaa cagauugaag 5880  
uaaccuguaa acuggcaaaa agagaaugag aucggauuaa aauguauggc aguaaguccu 5940  
auugaucccu ccaguuaucu caguaugacu gcaguauuuu cauucacuaa aaccacucac 6000  
uagauaccaa cuacacaccu ggcacugcag auguaaaggu cagucacaca uguucugacu 6060  
uuacagaguu cacaguagca guggaggaug auauaugugg aaacaaaaaa ggcauugauu 6120  
cuauucagag cacuguuagg gcucaaaagga gagagggguc uuuccaccua agaaaugagg 6180  
aaugggguca ucauagaagu gaccuuuagu cuuuuuuuuu aagaagggga uuccaagcug 6240  
cuucagacag agacacaucg agcuuuuaca cagagguaug aaagagcaca gggacuuuag 6300  
gaauugcaca guucauucua acaggaacaa aaggcucaag gggggcaaga aaugaggcug 6360  
uauggaaaga gauucaaugu aagcacuuua uaaaauagau uauuuucuga uucaaugaag 6420  
cauuucuuuga ucauugugua caaggcacua caugcaucau ggaaaauuca uuaggauuca 6480  
uugccagcac uuugcagaac ugauuuuuuu cagccucaag cuuuccagug gccaaagggga 6540  
aaugcugacu gcuuuucua uauuugaguc aaagauuuuu uauaugguca augaagacua 6600  
auauaagggc agugggauuu ucacagaugc augccauguu gucgagagcc ucuuagauuu 6660  
ucucaacugu gagaaagaaa aacgaaaauug uugaagacgu ugagucugga gaggggauac 6720  
uaaucacugu ccaguugggc acugguggga auggggaaau ggcacaggaa ugcaagccuc 6780  
uccaccuac cccccgaacu ccagccauac acucaucguu ucacaaaaua uaaaugaguu 6840  
agcauuuuuu guuucagagu aaauuuuucc uuuucccga augcaugaag auagaguaac 6900  
agacuucua cacuguuuu uuaggguaug gagaauuuag aagguuuuag aaauacugcu 6960

ES 2 765 573 T3

ucaauuuuuc aguuaaaaaa aaaucaggaa gcucuguuca uucaggcuau gcaccaugug 7020  
cacagucaag aauuagcaga aaccucucugc auuuacaaac acuuugugcu auaaaaaagu 7080  
aauuuuuuaa aagccacgug ugugugugug uauauauaua uauauauaua uauuuuaagc 7140  
caagguuuug auacuuuuuu acaaaaacua caagagaaaa caaaauuacc uguccaaacc 7200  
auauacuuiu aaaagagcau uuuuuuuucc auacaagcug uuguuaauuu ggggguaaag 7260  
ugcugauuug caaacuucan caaaauuguuc ccaaguggau ucuccuuguu ugucuccccc 7320  
uaccaacccc aaaguuacca uauuugaugu aagaaucagg cauguuagaa uguuguguca 7380  
cacuaacuga uucugcucuu uuugucuugu cauucaguu ccguuagcuu cuguacgcgg 7440  
ugcccuuugc agucuggugu cucuuccaga ggcgaggggg cugaggauug ggugcugcau 7500  
cucacuagcu auacuggcau caucuuggua aacugaaaac caaauuguga cauuguuaaa 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

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 ccccgugag aggagacagc cagugcgacu ccaccucca 60  
gcucgacggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agccccggcgc guccccgucc 120  
ccaccuccga ccaccgccag cgcuccaggc cccgccgcuc cccgcucgcc gccaccgcgc 180  
ccuccgcucc gcccgagug 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 cuccccggcc aaccgcaaga 480  
ucggcgugug caccgcaaa gauggugcuc ccugcaucuu cggugguacg guguaaccgca 540  
gcgagaguc cuuccagagc agcugcaagu accagugcac gugccuggac ggggaggugg 600  
gcugcaugcc ccugugcagc auggacguuc gucugcccag ccugacugc cccuucccga 660  
ggagggucua gcugcccggg aaaugcugcg aggagugggu gugugacgag cccaaggacc 720  
aaaccguggu ugggcccugcc cucgcgguu accgacugga agacacguuu ggcccagacc 780  
caacuaugau uagagccaac ugccuggucc agaccacaga guggagcgcg uguuccaaga 840  
ccugugggau gggcaucucc acccggguua ccaaugacaa cgcuccugc aggcuagaga 900  
agcagagccg ccugugcaug gucaggccuu gcgaagcuga ccuggaagag aacauuaaga 960  
agggcaaaaa gugcauccgu acucccaaaa ucuccaagcc uaucaaguuu gagcuuucug 1020  
gcugcaccag caugaagaca uaccgagcua aaucugugg aguanguacc gacggccgau 1080  
gcugcaccac ccacagaacc accaccugc cgguggaguu caagugcccu gacggcgagg 1140  
ucaugaagaa gaacaugaug uucaucaaga ccugugccug ccuuuacaac ugucgggag 1200  
acaaugacau cuuugaaucg cuguacuaca ggaagaugua cggagacaug gcaugaagcc 1260  
agagagugag agacauuaac ucauugacu ggaacuugaa cugauucaca ucucuuuuu 1320  
ccguaaaaau gauuucagua gcacaaguua uuuuuucug uuuuuucuaac ugggggaaaa 1380  
gauucccacc cauuucaaaa cauugugcca ugucaaaaa auagucuauc aaccccagac 1440  
acugguuuga agaauguuaa gacuugacag uggaacuaca uuaguacaca gcaccagaau 1500

ES 2 765 573 T3

guauauuaag	guguggcuuu	aggagcagug	ggagggguacc	agcagaaag	uuaguaucou	1560
cagauagcau	cuuauacgag	uaauaugccu	gcuauuugaa	guguaauuga	gaaggaaaau	1620
uuuagcgugc	ucacugaccu	gccuguagcc	ccagugacag	cuaggauug	cauucuccag	1680
ccaUCAagag	acugagucaa	guuguuccuu	aagucagaac	agcagacuca	gcucugacau	1740
ucugauucga	augacacugu	ucaggaaucg	gaauccuguc	gauuagacug	gacagcuugu	1800
ggcaagugaa	uuugccugua	acaagccaga	uuuuuuaaaa	uuuauauugu	aaauauugug	1860
ugugugugug	uguguguaa	uaauauaua	uguacaguua	ucuaaguuaa	uuuaaaguug	1920
uuugugccuu	uuuauuuuug	uuuuuaaugc	uuugauuuu	caauguuagc	cucauuuuu	1980
gaacaccaua	gguaagaugu	aaagcuuguc	ugaucguuca	aagcaugaaa	uggauacuua	2040
uauggaaaau	cugcucagau	agaaugacag	uccgucaaaa	cagauuguuu	gcaaagggga	2100
ggcaucagug	uccuuggcag	gcugauuuu	agguaggaaa	ugugguagcc	ucacuuuuua	2160
ugaacaaaug	gccuuuauua	aaaacugagu	gacucuauau	agcugaucag	uuuuuuuacc	2220
uggaagcauu	uguuuucuacu	uugauaugac	uguuuuucgg	acaguuuauu	uguugagagu	2280
gugaccaaaa	guuacauguu	ugcaccuuuc	uaguugaaaa	uaaaguguau	auuuuuucua	2340
uaaaaaaaaa	aaaaaaaaa					2358

<210> 20  
 <211> 349  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 765 573 T3

<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

ES 2 765 573 T3

		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

ES 2 765 573 T3

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 21

aggaaggagg	gguggccuga	ccccucggca	guccuccccc	ucagccuuuc	cccaauuugc	60
uacuucucug	gggcuccagg	uccugcuugu	gcucagcucc	agcucacugg	cuggccaccg	120
agacuucugg	acaggaaacu	gcaccauccu	cuucucccag	caagggggcu	ccagagacug	180
cccaccagc	aagucuggug	gccuggggau	uuggacagug	ccuugguaau	gaccagggcu	240
ccaggaagag	auguccuugu	ggcugggggc	cccugugccu	gacauuccuc	cugacucugc	300
gguggagcug	uggaagccag	gcgcacagga	ugcaagcagc	caggccagg	gaggcagcag	360
cugcauccuc	agagaggaag	ccaggaugcc	ccacucugcu	ggggguacug	cagggguggg	420
gcuggaggcu	gcagagccca	cagcccugcu	caccagggca	gagccccuu	cagaaccac	480
agagauccgu	ccacaaaagc	ggaaaaagg	gccagcccc	aaaaugcugg	ggaacgagcu	540
augcagcgug	uguggggaca	aggccucggg	cuuccacuac	aauguucuga	gcugcgagg	600
cugcaagga	uucuuccgcc	gcagcgucan	caagggagcg	cacuacaucu	gccacagugg	660
cggccacugc	ccaugggaca	ccuacaugcg	ucgcaagugc	caggaguguc	ggcuucgcaa	720
augccgucag	gcuggcaugc	gggaggagug	uguccuguca	gaagaacaga	uccgccugaa	780
gaaacugaag	cggcaagagg	aggaacaggc	ucaugccaca	uccuugcccc	ccagggcuuc	840
cucaccccc	caauuccugc	cccagcucag	cccggaaaca	cugggcauga	ucgagaagcu	900
cgucgcugcc	cagcaacagu	guaaccggcg	cuccuuuuuc	gaccggcuuc	gagucacgcc	960
uuggcccaug	gcaccagauc	cccauagccg	ggaggcccgu	cagcagcgcu	uugcccacuu	1020
cacugagcug	gccaucgucu	cugugcagga	gauaguugac	uuugcuaaac	agcuaccgg	1080
cuuccugcag	cucagccggg	aggaccagau	ugcccugcug	aagaccucug	cgaucgaggu	1140
gaugcuucug	gagacaucuc	ggagguacaa	cccugggagu	gagagauca	ccuuccucaa	1200
ggauuucagu	uauaaccggg	aagacuauugc	caaagcaggg	cugcaagugg	aaaucaucaa	1260
cccacucuc	gaguucucca	gggccaugaa	ugagcugcaa	cucaauggaug	ccgaguuugc	1320
cuugcucauu	gcuaucagca	ucuuucucugc	agaccggccc	aacgugcagg	accagcucca	1380
gguagagagg	cugcagcaca	cauauuggga	agcccugcau	gccuacgucu	ccauccacca	1440
uccccaugac	cgacugaugu	ucccacggau	gcuaaugaaa	cuggugagcc	uccggaccuu	1500
gagcagcguc	cacucagagc	aaguguuugc	acugcgucug	caggacaaaa	agcucccacc	1560
gcugcucucu	gagaucuggg	augugcacga	augacuguuc	uguccccaau	uuuucuguuu	1620
ucuuggccgg	auggcugagg	ccugguggcu	gccuccuaga	aguggaacag	acugagaagg	1680
gcaaacauuc	cugggagcug	ggcaaggaga	uccucccgug	gcuuuuuuag	agagucuaag	1740

ES 2 765 573 T3

gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga 1800  
 agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cuggggggcca cuuugcacag gguucuccag 1860  
 agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuucc acagggcccc aagaaaaauu 1920  
 cuccacuguc aaaaaaaaaa 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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

<210> 23  
 <211> 1759  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 aggaaggagg gguggccuga cccucuggca gucccucucc ucagccuuuc cccaaaauugc 60  
 uacuucucug gggcuccagg uccugcuugu gcucagcucc agcucacugg cuggccaccg 120  
 agacuucugg acaggaaacu gcaccauccu cuucucccag caagggggcu ccagagacug 180  
 cccaccagc aagucuggug gccuggggau uuggacagug ccuugguaau gaccagggcu 240  
 ccaggaagag auguccuugu ggcugggggc ccugugccu gacauuccuc cugacucugc 300  
 gguggagcug uggaagccag gcgcacagga ugcaagcagc caggcccagg gaggcagcag 360  
 cugcauccuc agagaggaag ccaggaucc ccacucugcu ggggguaacug cagggguggg 420  
 gcuggaggcu gcagagccca cagcccugcu caccagggca gagccccuu cagaaccac 480  
 agagauccgu ccacaaaagc ggaaaaaggg gccagcccc aaaauugcugg ggaacgagcu 540  
 augcagcug uguggggaca aggccucggg cuuccacuac aauguucuga gcugcgaggg 600  
 cugcaaggga uucuuccgcc gcagcguc auagggagcg cacuacauc gccacagugg 660  
 cggccacug cccauggaca ccuacaugcg ucgcaagugc caggaguguc ggcuuucgaa 720  
 augccgucag gcuggcaugc gggaggagug uguccuguca gaagaacaga uccgccugaa 780  
 gaaacugaag cggcaagagg aggaacaggc ucaugccaca uccuugcccc ccagggcuuc 840  
 cucaccccc caaaucucgc ccagcucag cccggaacaa cugggcauga ucgagaagcu 900  
 cgucgcugcc cagcaacagu guaaccggcg cuccuuuuu gaccggcuuc gagucacggu 960  
 gaugcuucug gagacaucuc ggagguacaa ccugggagu gagagua ca cuuccuca 1020  
 ggauuucagu uauaacggg aagacuugc caaagcaggg cugcaagugg aaaucauca 1080  
 ccccaucuc gaguucucca gggccaugaa ugagcugcaa cucaaugaug ccgaguugc 1140  
 cuugcucau gcuaucagca ucuucucugc agaccggccc aacgugcagg accagcucca 1200  
 gguagagagg cugcagcaca cauauugga agcccugcau gccuacgucu ccauccacca 1260  
 uccccaugac cgacugaugu ucccacggau gcuaaugaaa cuggugagcc uccggaccu 1320  
 gagcagcug cacucagagc aaguguuugc acugcgucug caggacaaa agcuccacc 1380  
 gcugcucucu gagaucuggg augugcacga augacuguuc uguccccaua uuuucuguuu 1440  
 ucuuggccgg auggcugagg ccugguggcu gccuccuaga aguggaacag acugagaagg 1500  
 gcaaacauuc cugggagcug ggcaaggaga uccucccgug gcuuuuuag agagucuaag 1560  
 gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga 1620

ES 2 765 573 T3

agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cuggggggcca cuuugcacag gguucuccag 1680  
 agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuccc acagggcccc aagaaaaauu 1740  
 cuccacuguc aaaaaaaaaa 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

ES 2 765 573 T3

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 aggccaggg aggcagcagc ugcauccuca	180

ES 2 765 573 T3

gagaggaagc caggaugccc cacucugcug gggguacugc aggggugggg cuggaggcug 240  
cagagcccac agcccugcuc accagggcag agcccccuc agaaccaca gagauccguc 300  
cacaaaagcg gaaaaagggg ccagcccca aaaugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu 360  
guggggacaa ggccucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau 420  
ucuuccgccc cagcgucauc aaggggagcgc acuacaucug ccacaguggc ggccacugcc 480  
ccauggacac cuacaugcgu cgcaagugcc aggagugucg gcuucgcaa ugcgcugcag 540  
cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc 600  
ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc cagggcuucc ucaccccccc 660  
aaauccugcc ccagcucagc ccggaacaac ugggcaugau cgagaagcuc gucgcugccc 720  
agcaacagug uaaccggcgc uccuuuucug accggcuucg agucacgccu uggcccagg 780  
caccagaucc ccuagcccgg gagggcccugc agcagcgcuu ugcccacuuc acugagcugg 840  
ccaucgucuc ugugcaggag auaguugacu uugcuaaaca gcuaccggc uuccugcagc 900  
ucagcccggga ggaccagauu gccucguga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg 960  
agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu 1020  
auaaccggga agacuugcc aaagcagggc ugcaagugga auucaucaac cccaucuucg 1080  
aguucuccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguugcc uugcucauug 1140  
cuacagcau cuucucugca gaccggcca acgugcagga ccagcuccag guagagaggc 1200  
ugcagcacac auauguggaa gccucgcaug ccuacgucuc cauccaccu cccaugacc 1260  
gacugauguu cccacggaug cuaaugaaac uggugagccu ccggaccucg agcagcgucc 1320  
acucagagca aguguuugca cugcgucugc aggacaaaaa gcuccaccg cugcucucug 1380  
agaucuggga ugugcacgaa ugacuguucu guccccauau uuucuguuuu cuuggccgga 1440  
uggcugaggc cugguggcug ccuccuagaa guggaacaga cugagaaggg caaacauucc 1500  
ugggagcugg gcaaggagau ccucccgugg cauuaaaaga gagucaaaagg guugcgaguu 1560  
uuguggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug 1620  
accccacaaa cggaugggcc ugggggccac uuugcacagg guucuccaga gccucgcca 1680  
uccugccucc accacuuccu guuuuucca cagggcccca agaaaaaucc 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



ES 2 765 573 T3

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 agaccuaggg caaagccaag guacagcuuc 60  
 agggaagucu uuggugagcc caucucucau uaccaaggua acgaagcgca gacuccgggc 120  
 ccgggugggc ggcaucacca ccagguucac gccgagaagg agcuggagga gagccgcccg 180  
 gcuccagccg gaccgcuugc ccgccaucac cguuguaauc uaugcagcaa acaagcugga 240  
 acccgcuuggg uggcaccugc aagcagccgc ccggacgcac ccacucugcg guggagcugu 300  
 ggaagccagg cgcacaggau gcaagcagcc aggcccaggg aggcagcagc ugcauccuca 360  
 gagaggaagc caggaugccc cacucugcug gggguacugc aggggugggg cuggaggcug 420  
 cagagcccac agcccugcuc accagggcag agccccuuc agaaccaca gagauccguc 480  
 cacaaaagcg gaaaaagggg ccagccccca aaaugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu 540

ES 2 765 573 T3

guggggacaa ggccucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau 600  
 ucuuccgccc cagcgucauc aagggagcgc acuacaucug ccacaguggc ggccacugcc 660  
 ccauggacac cuacaugcgu cgcaaugucc aggagugucg gcuucgcaa ugccgucagg 720  
 cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc 780  
 ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc cagggcuucc ucaccccccc 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 gccucgcuga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg 1140  
 agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu 1200  
 auaaccggga agacuugcc aaagcagggc ugcaagugga auucaucaac cccaucuucg 1260  
 aguucccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguugcc uugcucauug 1320  
 cuaucagcau cuucucugca gaccggccca acgugcagga ccagcuccag guagagaggg 1380  
 ugcagcacac auauguggaa gccucgcaug ccuacgucuc cauccaccu cccaugacc 1440  
 gacugauguu cccacggaug cuaaugaaac uggugagccu cggaccucg agcagegucc 1500  
 acucagagca aguguuugca cugcgucugc aggacaaaaa gcucccaccg cugcucucug 1560  
 agaucuggga ugugcacgaa ugacuguucu guccccauau uuucuguuuu cuuggccgga 1620  
 uggcugagggc cugguggcug ccuccuagaa guggaacaga cugagaaggg caaacauucc 1680  
 ugggagcugg gcaaggagau ccucccgugg cauuaaaaga gagucaaagg guugcgaguu 1740  
 uuugggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug 1800  
 accccacaaa cggaugggcc ugggggccac uuugcacagg guucuccaga gccucgccc 1860  
 uccugccucc accacuuccu guuuuuccca cagggcccca agaaaaauuc uccacuguca 1920  
 aaaaaaaaa 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

ES 2 765 573 T3

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



ES 2 765 573 T3

guucccugga uacccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcgcc ccuucuucuu 360  
 cacccacugu aaaggaggag gguccggagc cguggcccgg ggguccggac ccugaugucc 420  
 caggcacuga ugaggccagc ucagccugca gcacagacug ggucauccca gaucccgaa 480  
 aggaaccaga gcgcaagcga aagaagggcc cagccccgaa gaugcugggc cacgagcuuu 540  
 gccugugucug uggggacaag gccuccggcu uccacuacaa cgugcucagc ugcgaaggcu 600  
 gcaaggguuu cuuccggcgc aguguggucc gugguggggc caggcgcuau gccugccggg 660  
 gugcggaac cugccagaug gacgcuuuca ugcggcgcaa gugccagcag ugccggcugc 720  
 gcaagugcaa ggaggcaggg augagggagc agugcguccu uucugaagaa cagaucggga 780  
 agaagaagau ucggaaacaa cagcagcagg agucacaguc acagucgcag ucaccugugg 840  
 ggccgcaggg cagcagcagc ucagccucug ggccuggggc uccccuggu ggaucugagg 900  
 caggcagcca gggcuccggg gaagcgcagg guguccagcu aacagcggcu caagaacuaa 960  
 ugauccagca guugguggcg gcccaacugc agugcaacaa acgcuccuuc uccgaccagc 1020  
 ccaaagucac gcccuggccc cugggcgcag acccccaguc ccgagaugcc cgccagcaac 1080  
 gcuuugccca cuucacggag cuggccauca ucucagucca ggagaucgug gacuucgcuu 1140  
 agcaagugcc ugguuuccug cagcugggcc gggaggacca gaucgcccuc cugaaggcau 1200  
 ccacuaucga gaucaugcug cuagagacag ccaggcgcuu caaccacgag acagagugua 1260  
 ucaccuucuu gaaggacuuc accuacagca aggaagacu ccaccgugca ggccugcagg 1320  
 uggaguucuu caaccccauc uucgaguucu cgcgggccau gcggcggcug ggccuggacg 1380  
 acgcugagua cgccugcuc aucgccauca acaucuucuc ggccgaccgg cccaacgugc 1440  
 aggagccggg ccgcguggag gcguugcagc agcccuacgu ggaggcgugc cuguccuaca 1500  
 cgcgcaucua gaggccgcag gaccagcugc gcuucccgcg caugcucaug aagcugguga 1560  
 gccugcgcac gcugagcucu gugcacucgg agcaggucuu cgccuugcgg cuccaggaca 1620  
 agaagcugcc gccucugcug ucggagauca gggacgucca cgagugaggg gcuggccacc 1680  
 cagccccaca gccuugccug accaccucc agcagauaga cgccggcacc ccuuccucuu 1740  
 ccuagggugg aaggggccc gggccgagcc uguagaccua ucggcucuca ucccuuggga 1800  
 uaagccccag uccaggucca ggaggcuccc uccugccca gcgagucuuc cagaaggggu 1860  
 gaaagggguug caggucccga ccacugacc uucccgugc ccuuccucc ccagcuuaca 1920  
 ccucaagccc agcacgcagu gcaccuugaa cagagggagg ggaggacca uggcucuccc 1980  
 ccuagccccg ggagaccagg gccuuccucu uccucugcuu uuauuuaua aaaacuaaaa 2040  
 acagaaacag gaaaauaaaa uaugaauaca auccagcccg gacuggagu gca 2093

<210> 30  
 <211> 461

ES 2 765 573 T3

<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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

<400> 31  
 ucgucaaguu ucacgcuccg cccucucucc 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  
 gaggggaggg accuggagag aggcugcucc gugacccccac cauguccucu ccuaccacga 300  
 guucccugga uacccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcggc ccuucucuu 360  
 caccacuguu aaaggaggag gguccggagc cguggccccg 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 ccccagucc cgagaugccc 780  
 gccagcaacg cuuugccccac uucacggagc ugGCCaucau cucaguccag gagaucgugg 840  
 acuucgcuaa gcaagugccu gguuuccugc agcuggggccg ggaggaccag aucgcccucc 900  
 ugaaggcauc cacuaucgag aucaugcugc uagagacagc caggcgcuac aaccacgaga 960  
 cagaguguauc cacuuucug aaggacuua ccuacagcaa ggacgacuuc caccgugcag 1020  
 gccugcaggu ggaguucauc aaccccaucu ucgaguucuc gcggggccaug cggcggcug 1080  
 gccuggacga cgcugaguac gccucgcuca ucgccaucaa caucuuucug gccgaccggc 1140  
 ccaacgugca ggagccgggc cgcguggagg cguugcagca gcccuacgug gaggcgcugc 1200  
 uguccuacac gcgcaucaag aggccgcagg accagcugcg cuucccgcg augcucauga 1260  
 agcuggugag ccugcgcacg cugagcucug ugcacucgga gcaggucuu gccuugcggc 1320  
 uccaggacaa gaagcugccg ccucugcugu cggagaucug ggacguccac gagugagggg 1380  
 cuggccaccc agccccacag ccuugccuga ccaccucca gcagauagac gccggcacc 1440  
 cuuccucuu cuagggugga aggggcccug ggccgagccu guagaccuau cggcucucuu 1500  
 cccuugggau aagccccagu ccagguccag gaggcucccu cccugcccag cgagucuucc 1560  
 agaaggggug aaaggguuugc aggucccgc cacugacccu ucccggcugc ccuccucucc 1620  
 cagcuuacac cucaagccca gcacgcagug caccuugaac agagggaggg gaggaccuau 1680  
 ggcucucucc ccuagcccgg gagaccaggg ccuuccucuu ccucugcuuu uauuuauaa 1740  
 aaacuaaaaa cagaaacagg aaaauaaaau augaaucua uccagcccgg agcuggagug 1800  
 ca 1802

ES 2 765 573 T3

<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

ES 2 765 573 T3

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

ES 2 765 573 T3

<400> 35  
 cgggaaugcc gcggcgggga cggcgauugg uccguaugug uggugccacc ggccgcccgc 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 cuggccccaau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60  
 acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uaugggugcc 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  
 gatccgcca gtgctcagac taccctgcc tcctgtcag gaacaggtag tctgaacact 60  
 gggtttttga att 73

<210> 41  
 <211> 69  
 <212> ADN

ES 2 765 573 T3

<213> Homo sapiens

<400> 41

gatccgcggc gggaaacggcg atcggccctt cctgtcagga ccaatcgccg tccccgccgt 60

ttttgaatt

69

<210> 42

<211> 73

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

gatccgtgga agattagtga gtttattatc ttctgtcag 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

ES 2 765 573 T3

<400> 51 ccgggaagga gttgaaggcc tacaactoga gttgtaggcc ttcaactcct tcttttt	57
<210> 52 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial	
<220> <223> shAPOE Sintético	
<400> 52 ccgggcagac actgtctgag caggtctcga gacctgetca gacagtgtct gcttttt	57
<210> 53 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial	
<220> <223> shADNJA Sintético	
<400> 53 ccgggcgaga agtttaaact catatctcga gatatgagtt taaacttctc gcttttt	57
<210> 54 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial	
<220> <223> shADNJA4 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 ApoE sintético

**<400> 57**  
**atccctggat ccatgtggga aagcctgacc c** **31**

<210> 58  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso ADNJA4 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	
<b>&lt;400&gt;</b>	<b>62</b>	
	gaacuaauuca cgccucauc	19
<210>	63	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo ApoE sintético	
<b>&lt;400&gt;</b>	<b>63</b>	
	tgggtcgctt ttgggattac	20
<210>	64	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso ApoE sintético	
<b>&lt;400&gt;</b>	<b>64</b>	
	ttcaactcct tcatggtctc g	21
<210>	65	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo ADNJA4 sintético	
<b>&lt;400&gt;</b>	<b>65</b>	
	ccagcttctc ttcacccatg	20
<210>	66	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso ADNJA4 sintético	
<b>&lt;400&gt;</b>	<b>66</b>	
	gccaatctct tcgtgactcc	20
<210>	67	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo GAPDH sintético	

<p>&lt;400&gt; 67 agccacatcg ctcagacac</p>	19
<p>&lt;210&gt; 68 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético GAPDH sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 68 gcccaatagc accaaatcc</p>	19
<p>&lt;210&gt; 69 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador directo LRP1 sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 69 ttaaacagca ccgagtacca g</p>	21
<p>&lt;210&gt; 70 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador inverso LRP1 sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 70 caggcagatg tcagagcag</p>	19
<p>&lt;210&gt; 71 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador directo LRP8 sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 71 gctaccctgg ctacgagatg</p>	20
<p>&lt;210&gt; 72 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador inverso LRP8 sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 72 gattagggat gggctcttgc</p>	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 ggggacctt ggtcctact 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 caattgcgggc 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 agccgtcttc acaggggtgga ccctagttta ata	43
<210> 87 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
<400> 87 gggatcgggtg 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 cataaaaaaca 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 gcgaaactgag

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  
 ttcttgcctt 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  
 ccttttctcc 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

ES 2 765 573 T3

<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 taccaccttc ttgaactcga gttcaagaag gtgatacact ctttttt 57

<210> 113  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sintético

<400> 113  
ccgggaaggg 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	

<p>&lt;400&gt; 120 agccacatcg ctgagacac</p>	19
<p>&lt;210&gt; 121 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 121 gcccaatacg accaaatcc</p>	19
<p>&lt;210&gt; 122 &lt;211&gt; 22 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 122 gttataaccg ggaagacttt gc</p>	22
<p>&lt;210&gt; 123 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 123 aaactcggca tcattgagtt g</p>	21
<p>&lt;210&gt; 124 &lt;211&gt; 22 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 124 tttgagggtg tttgagtagc gg</p>	22
<p>&lt;210&gt; 125 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 125 ctctcgcgga gtgaactac</p>	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 tgggtggtgaa

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

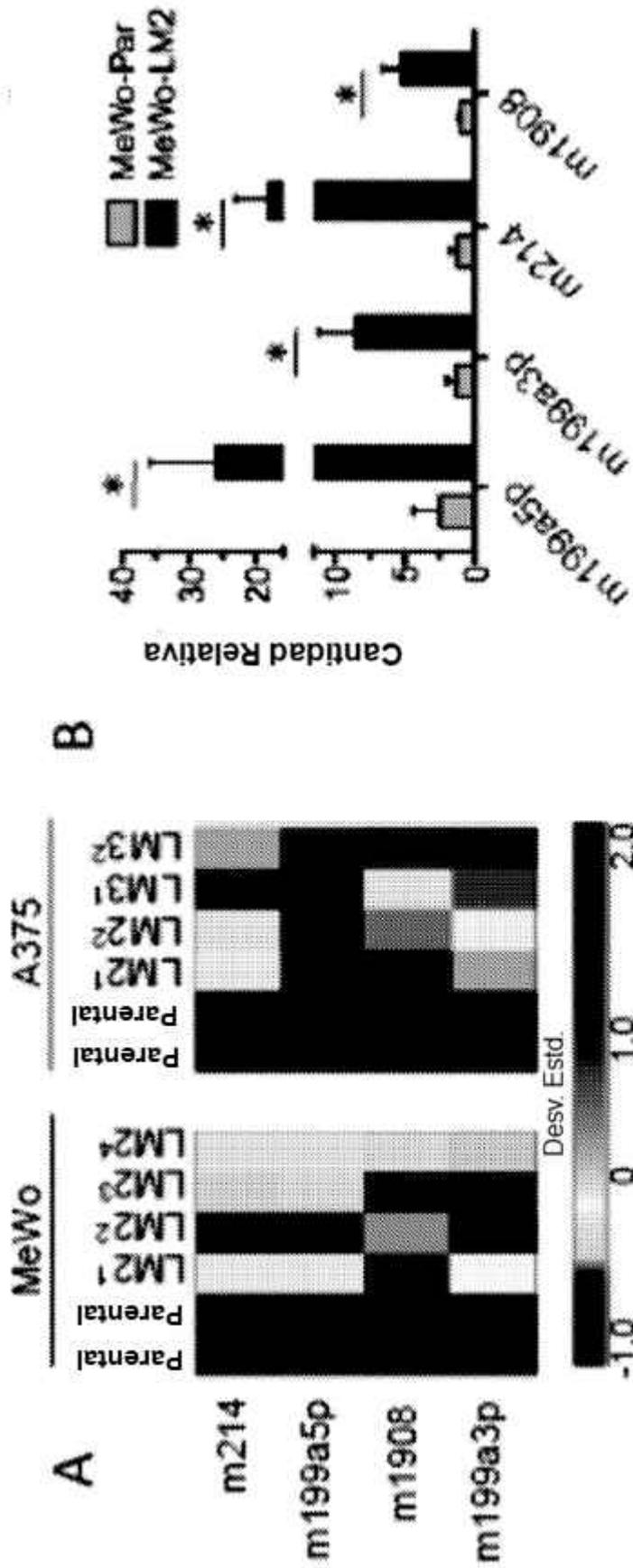
<213> Artificial

<220>

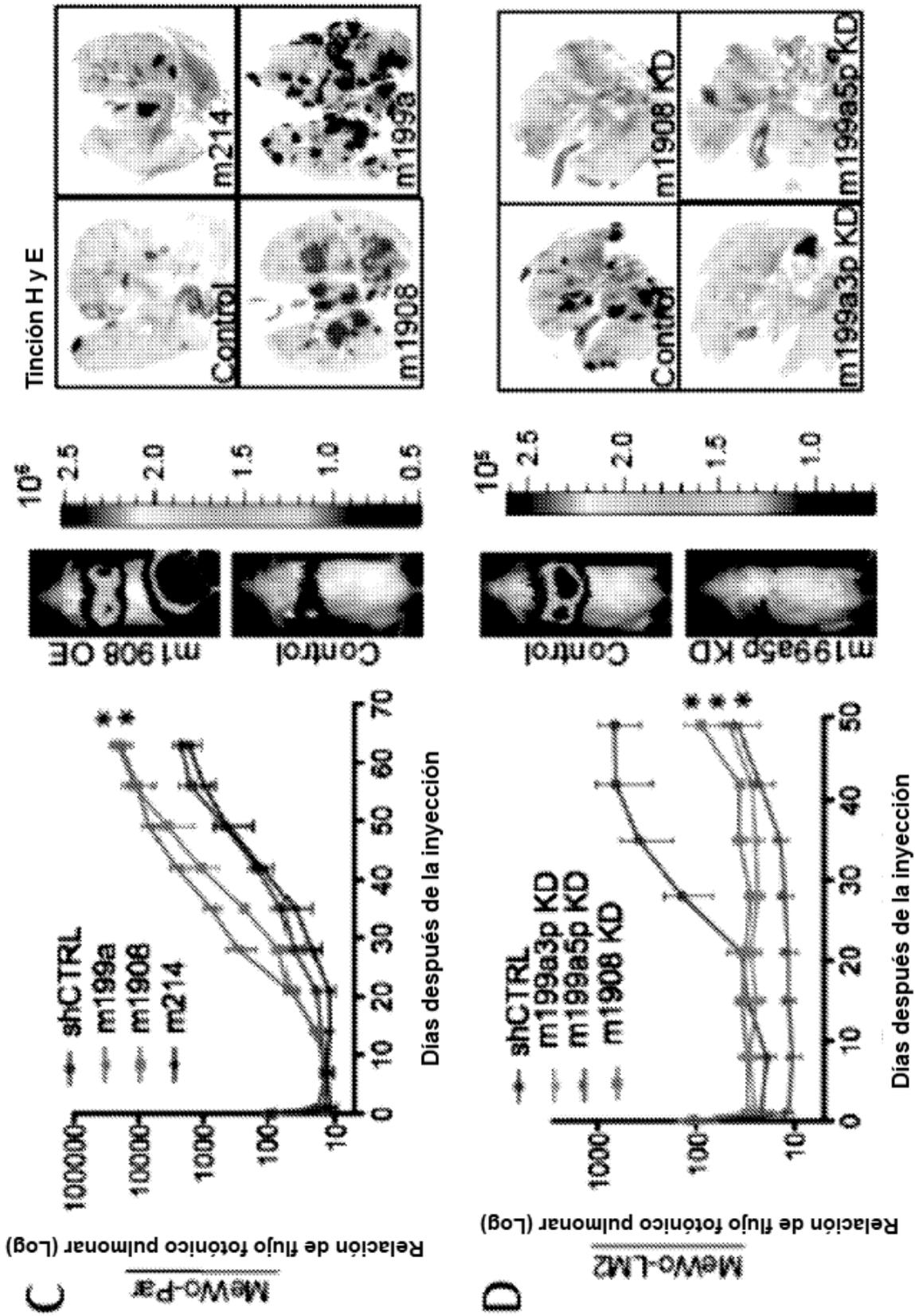
<223> Cebador sintético

<p>&lt;400&gt; 136  tcatagctag cgcagagcca ggattcacgc cctg</p>	34
<p>&lt;210&gt; 137  &lt;211&gt; 35  &lt;212&gt; ADN  &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 137  tggctctcga ggaaccttca tcttctgccc tgtga</p>	35
<p>&lt;210&gt; 138  &lt;211&gt; 30  &lt;212&gt; ADN  &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 138  tagttacgcg tagtagcccc catctttgcc</p>	30
<p>&lt;210&gt; 139  &lt;211&gt; 29  &lt;212&gt; ADN  &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 139  aatcagctag cccctcagct gcaaagctc</p>	29
<p>&lt;210&gt; 140  &lt;211&gt; 29  &lt;212&gt; ADN  &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 140  tagttacgcg tagtagcccc ctctttgcc</p>	29
<p>&lt;210&gt; 141  &lt;211&gt; 31  &lt;212&gt; ADN  &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;223&gt; Cebador sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 141  aatcagctag cccttcagct gcaaagctct g</p>	31





FIGURAS 1A-B



FIGURAS 1C-D

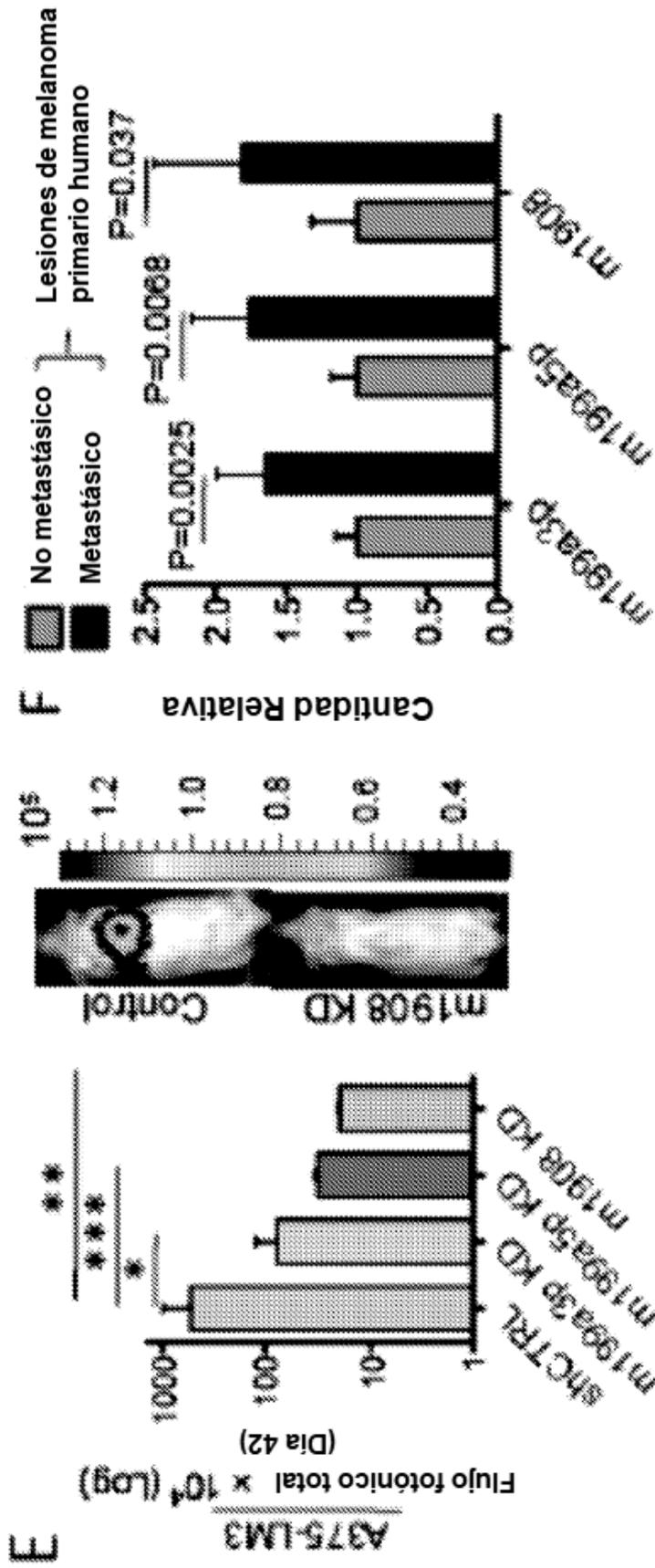
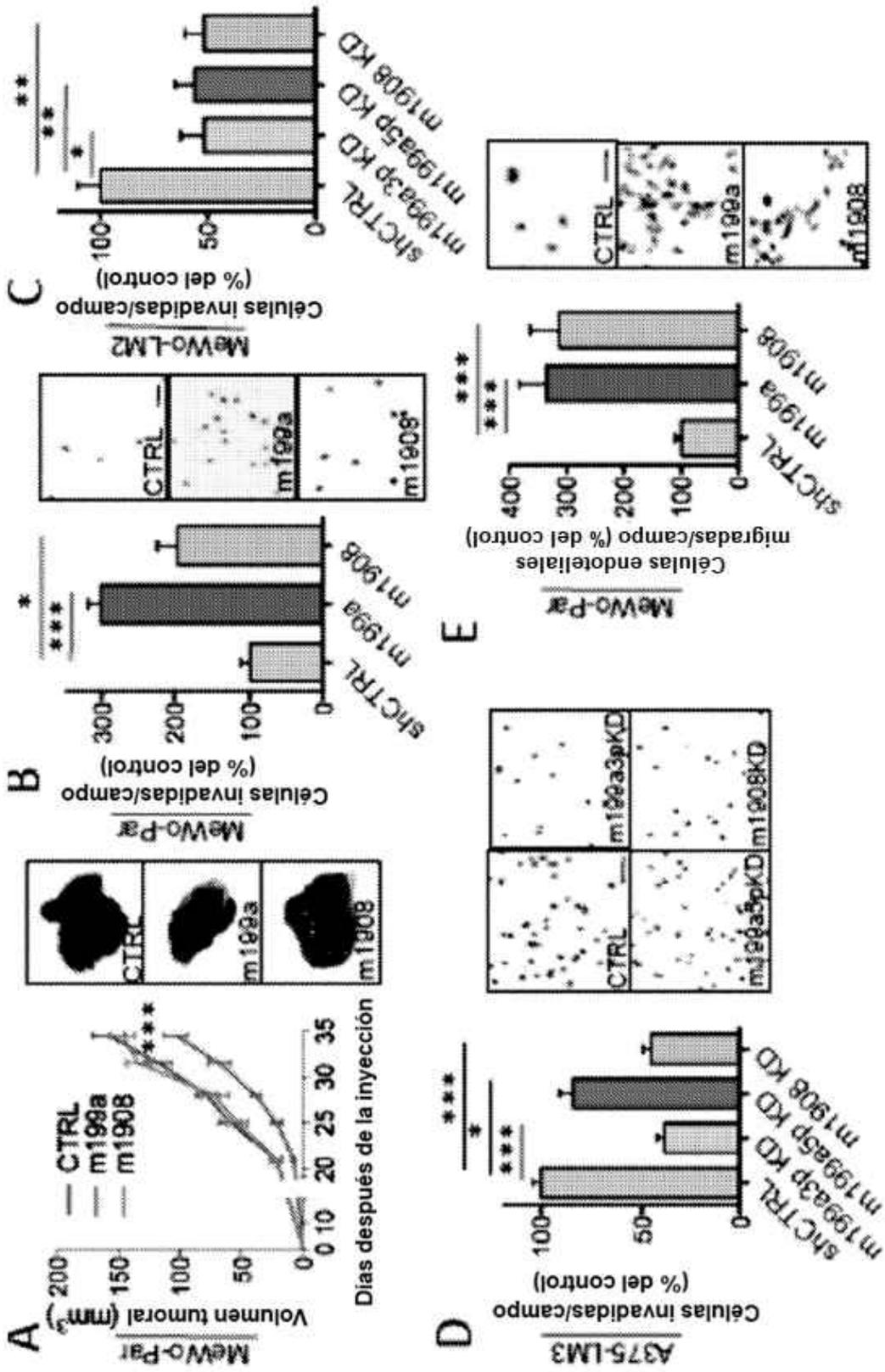


FIGURA 1E



FIGURAS 2A-E

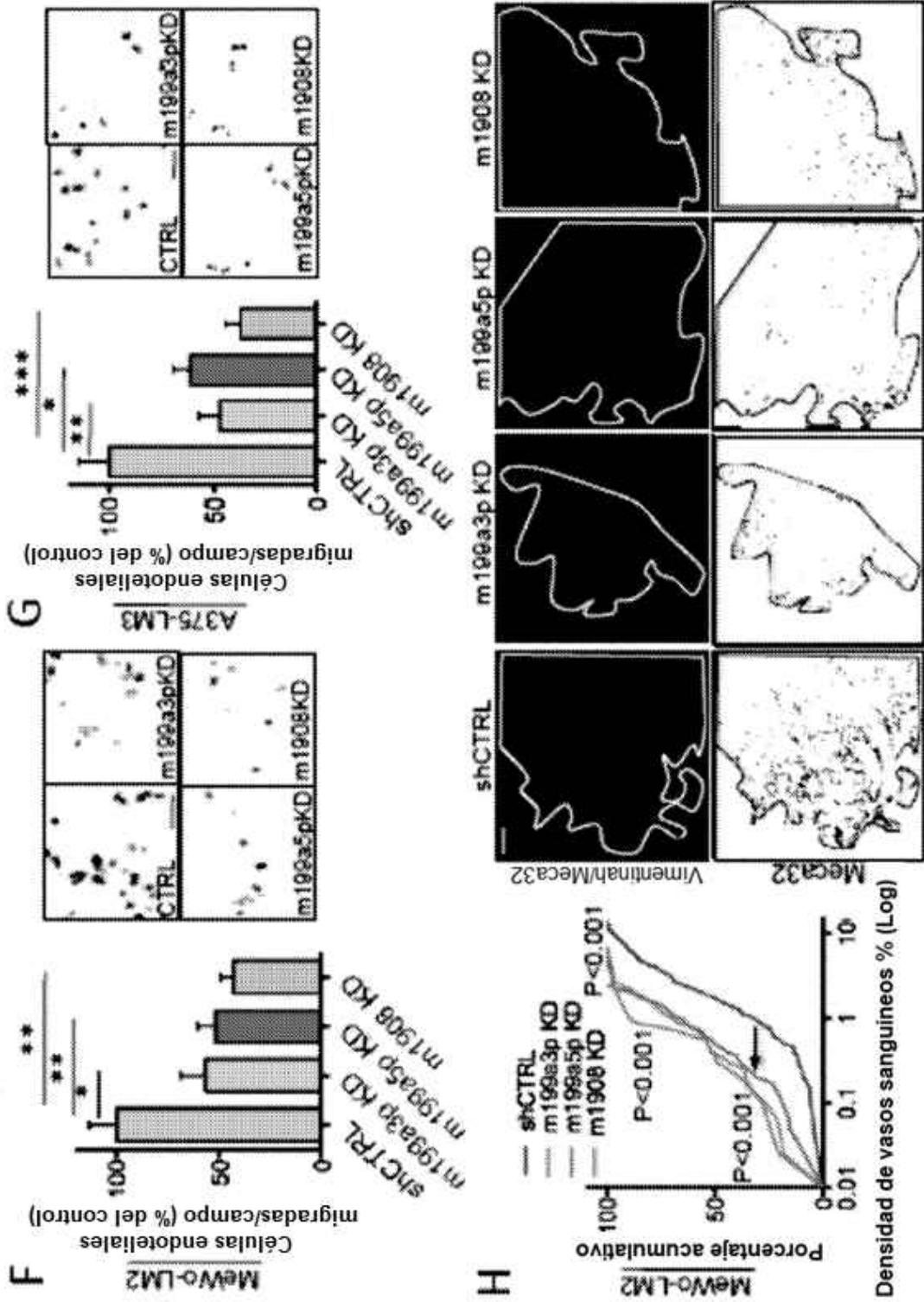
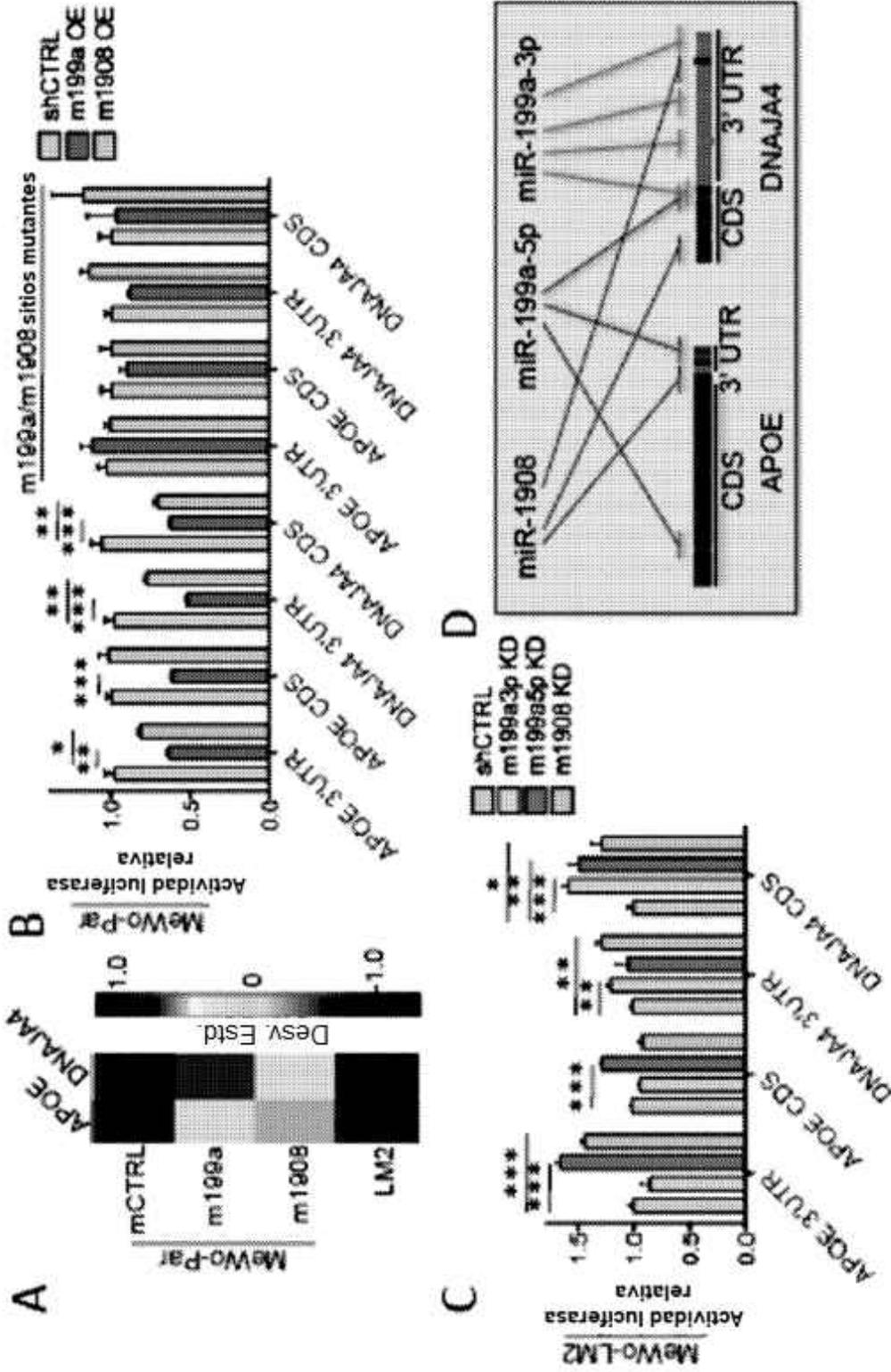
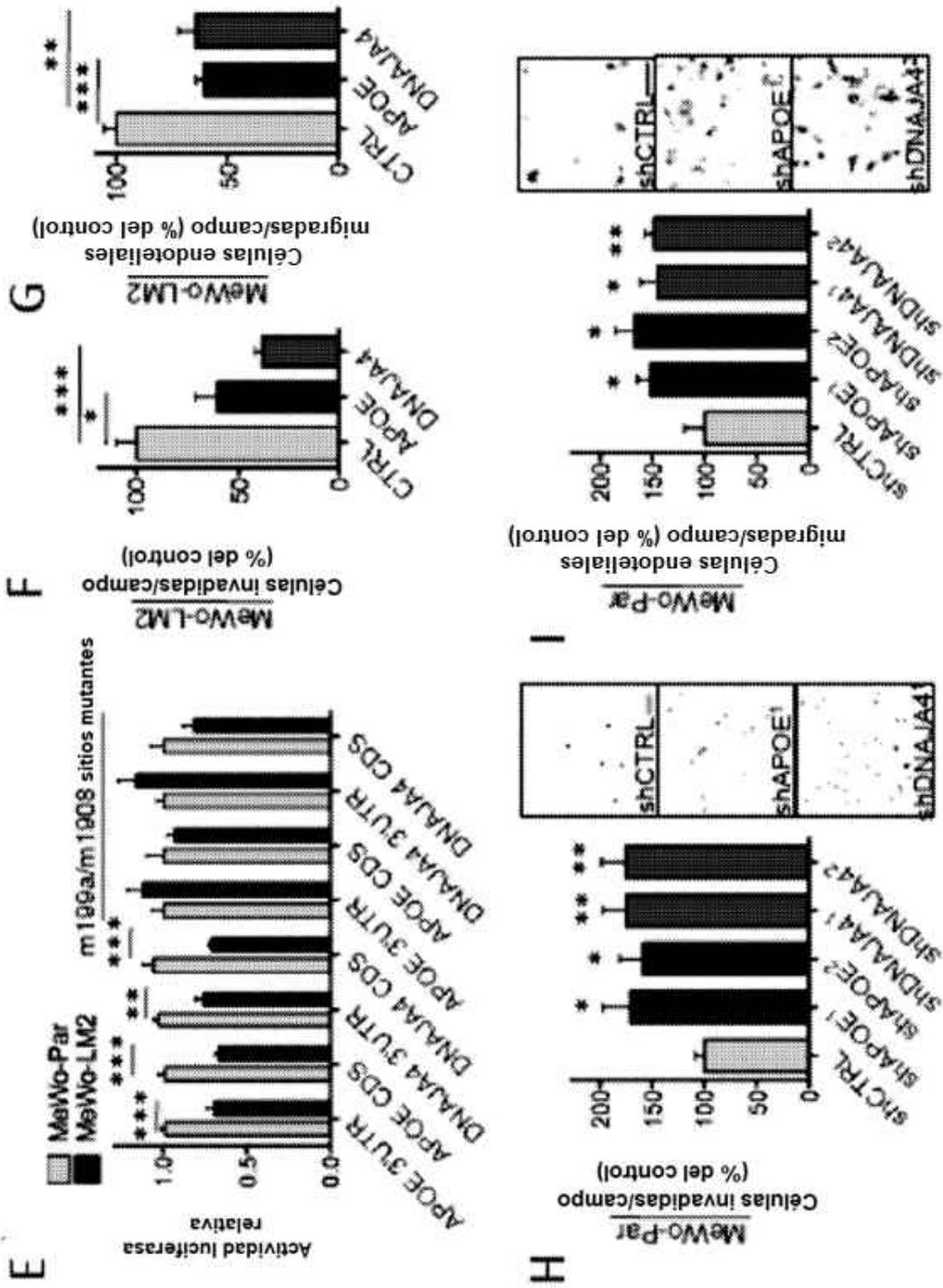


Figura 3

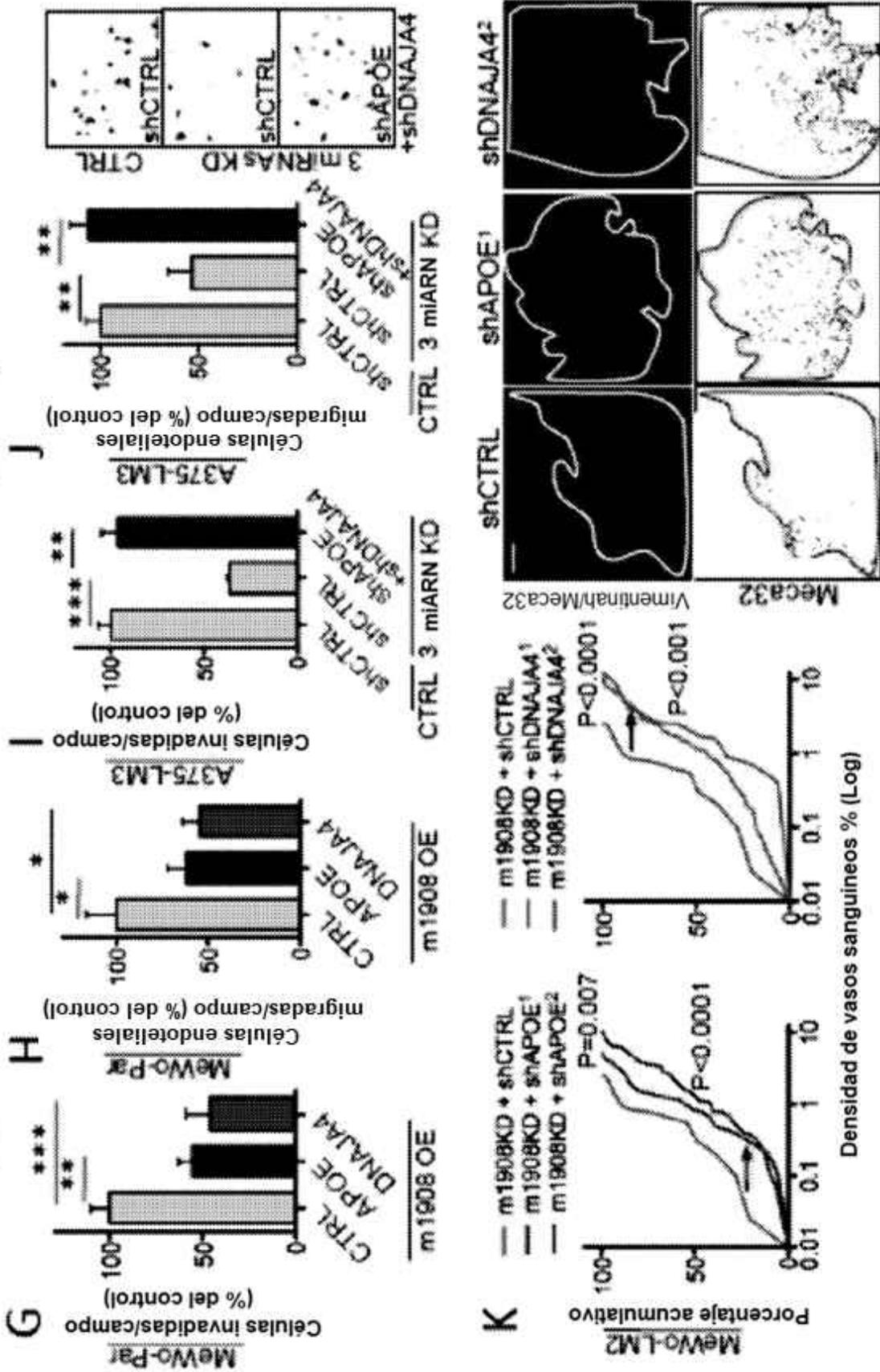


FIGURAS 3A-D

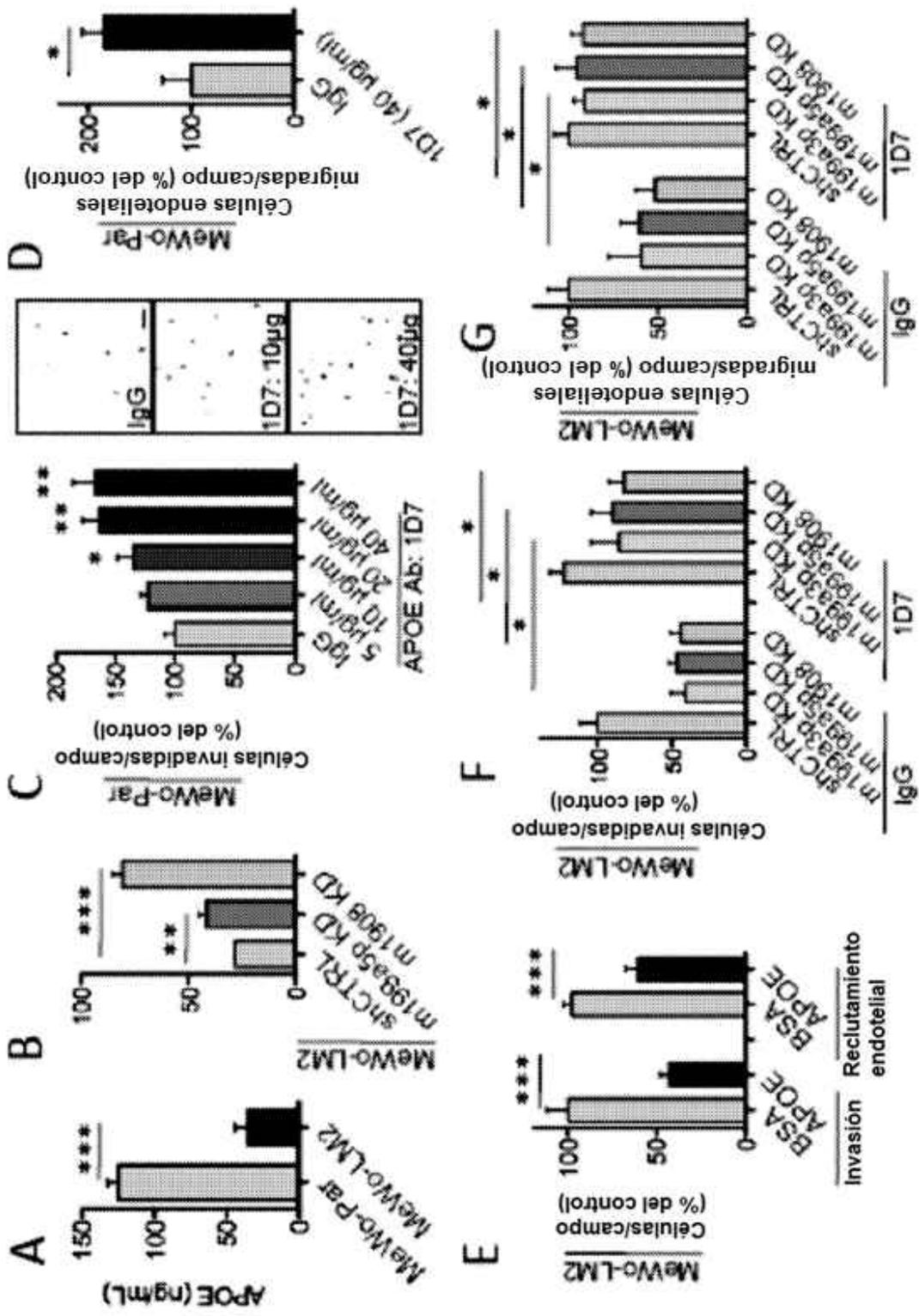


FIGURAS 3E-I

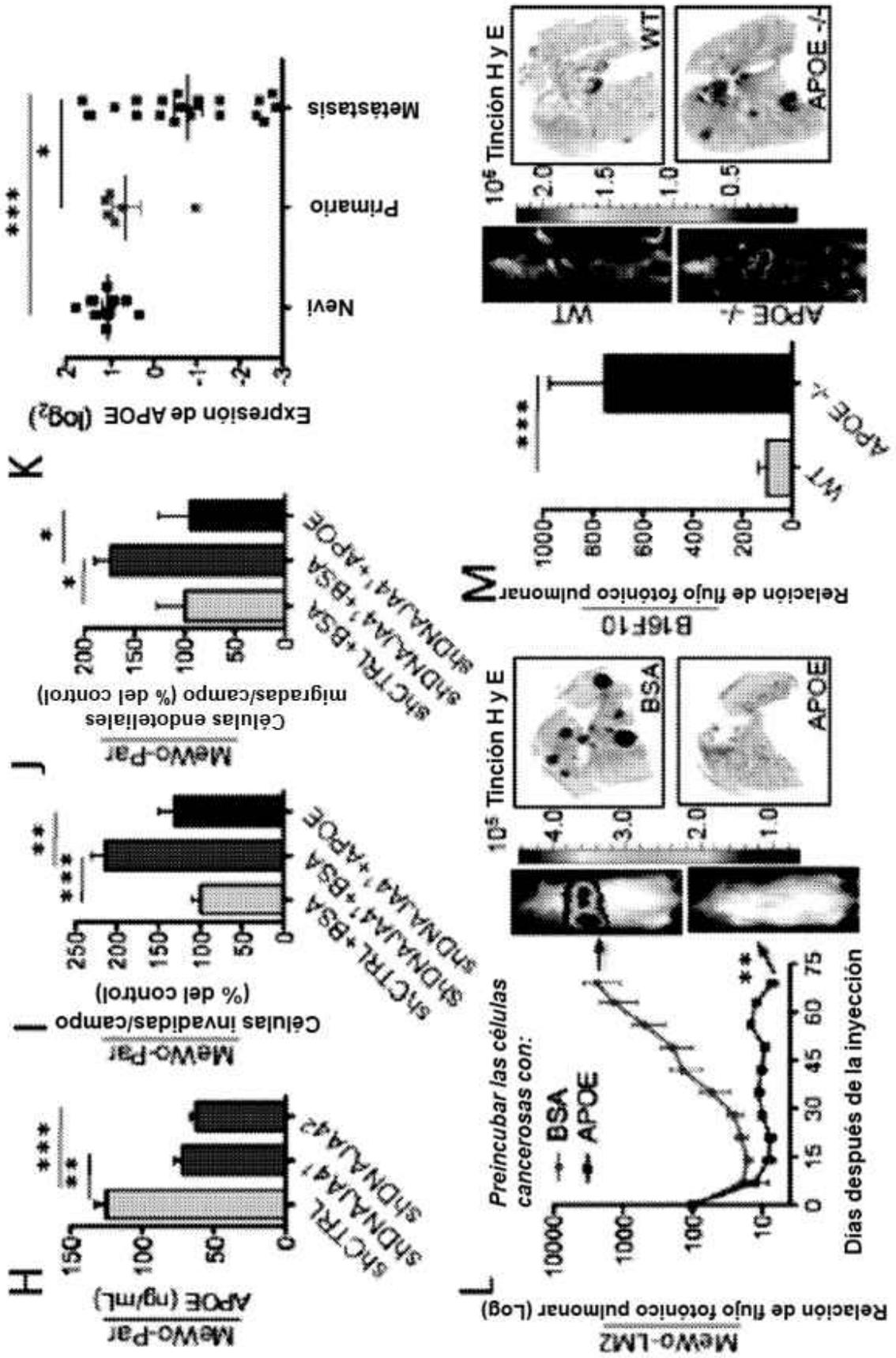




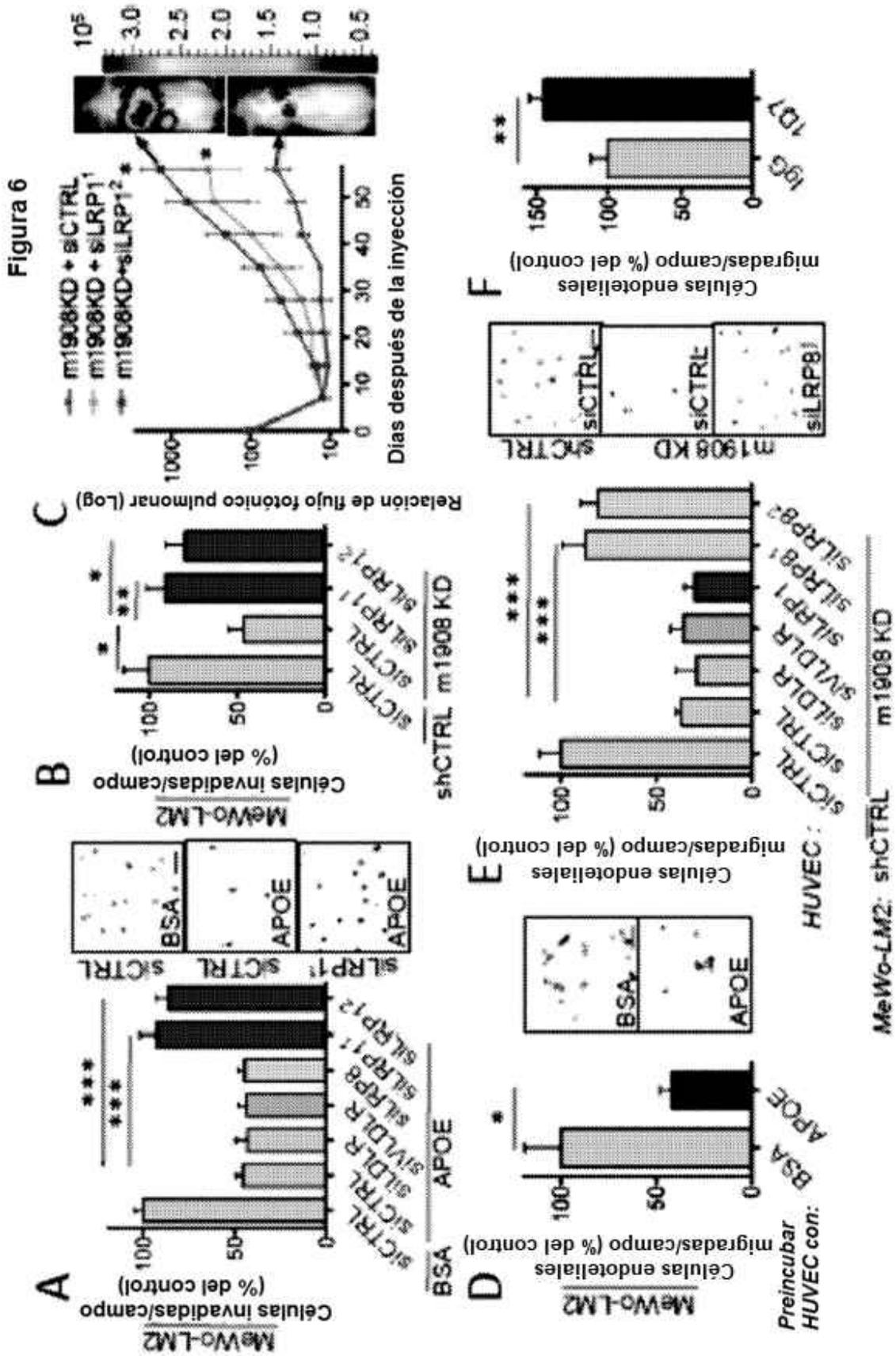
FIGURAS 4G-K



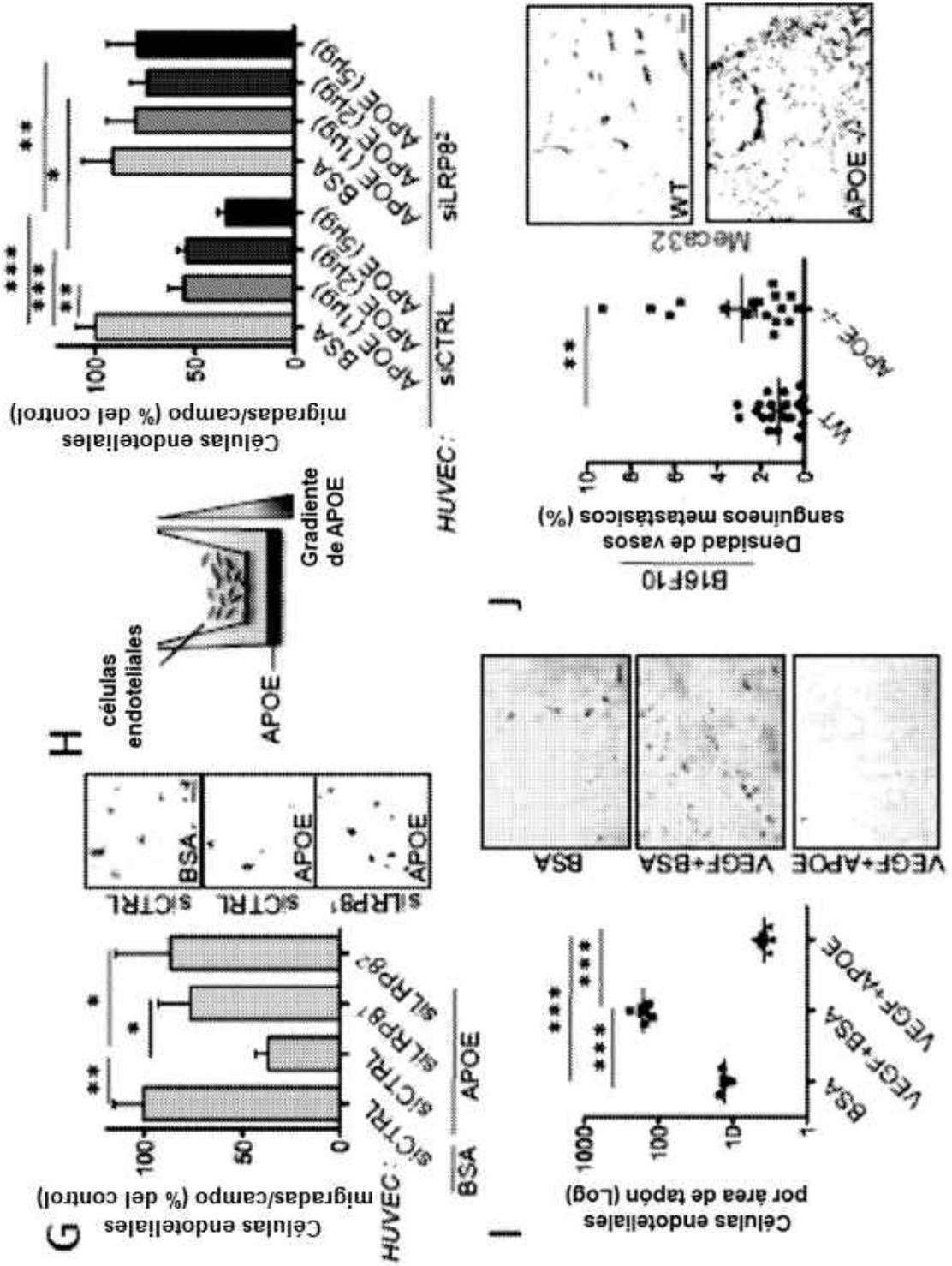
FIGURAS 5A-G



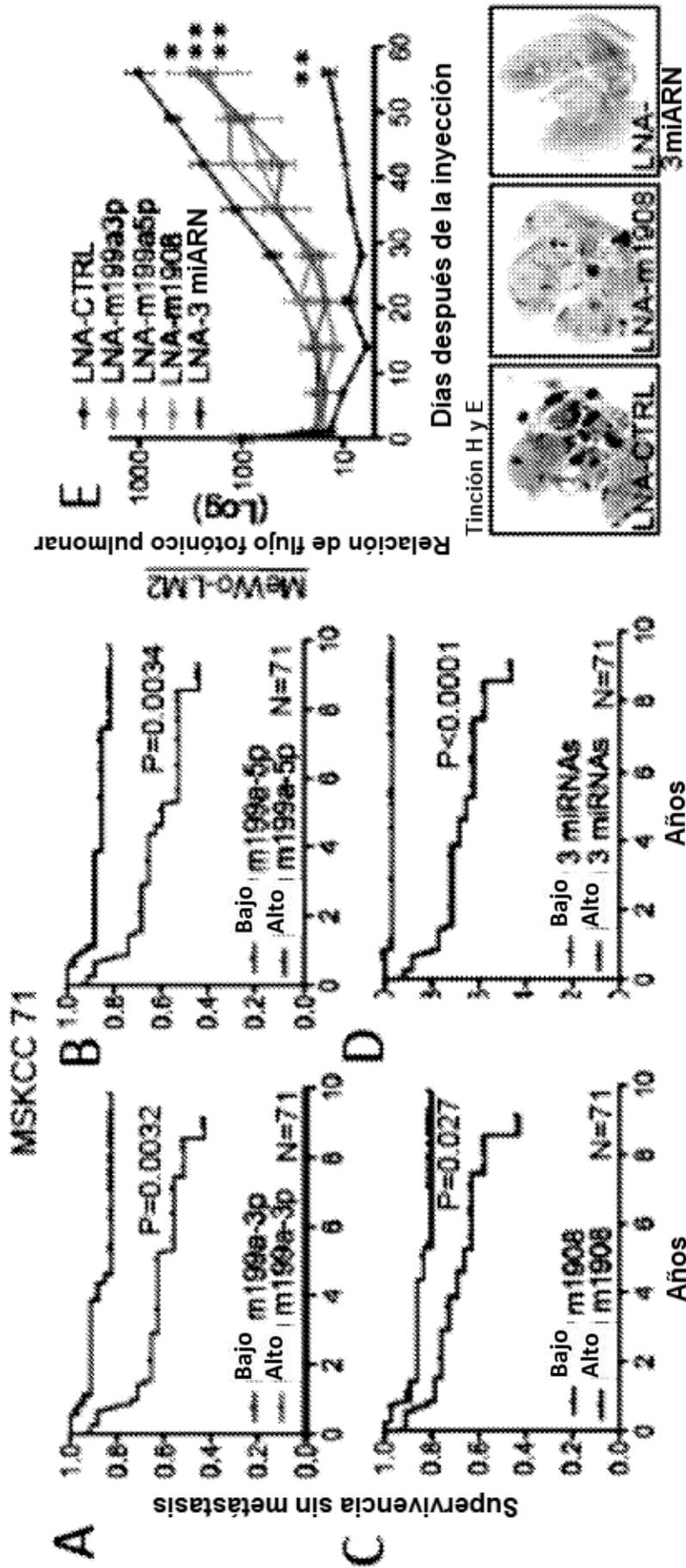
FIGURAS 5H-M



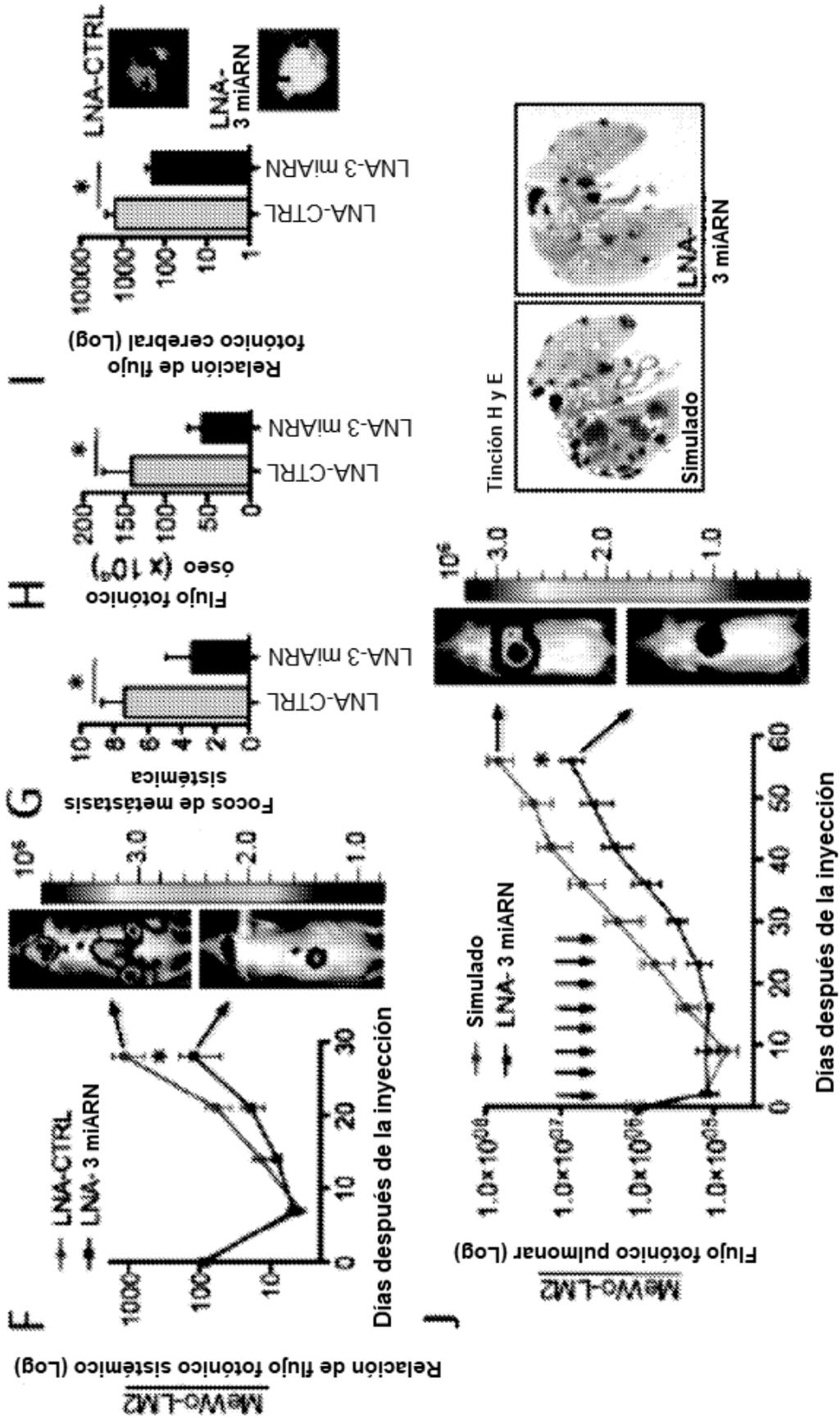
FIGURAS 6A-F



FIGURAS 6G-J



FIGURAS 7A-E



FIGURAS 7F-J

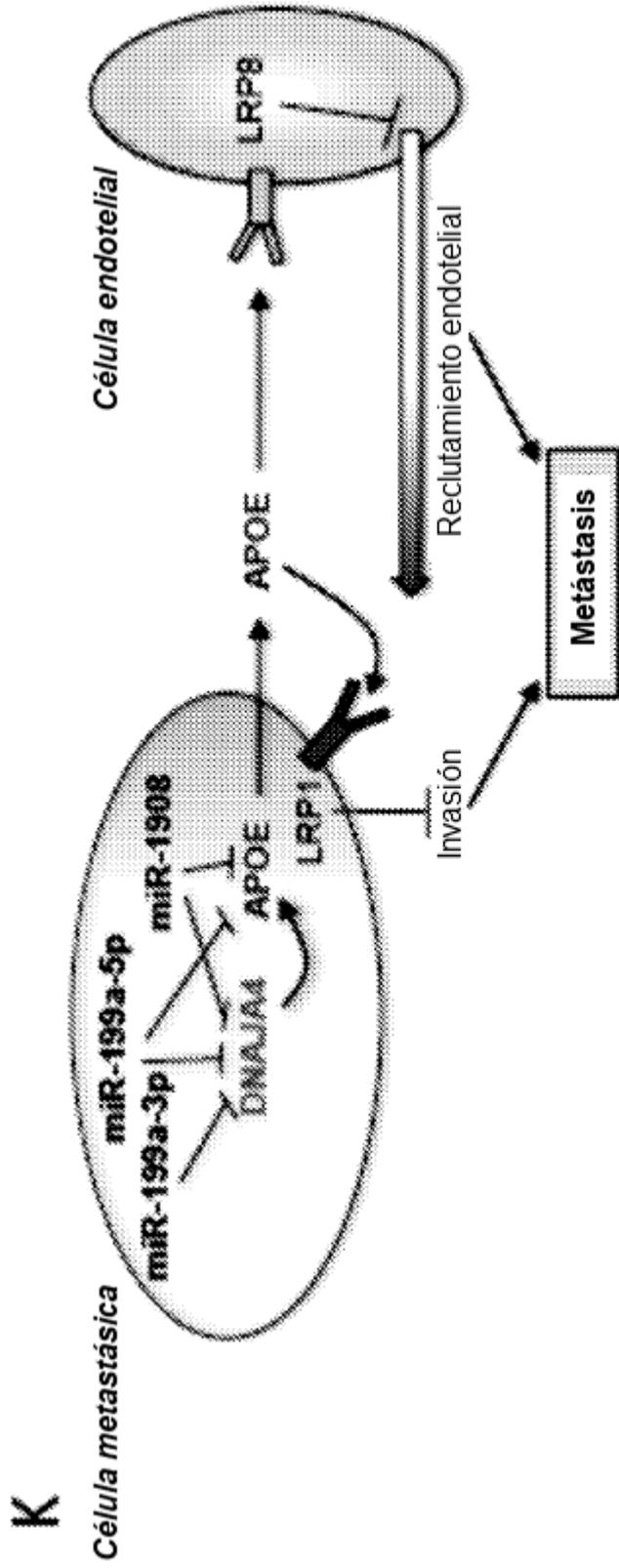
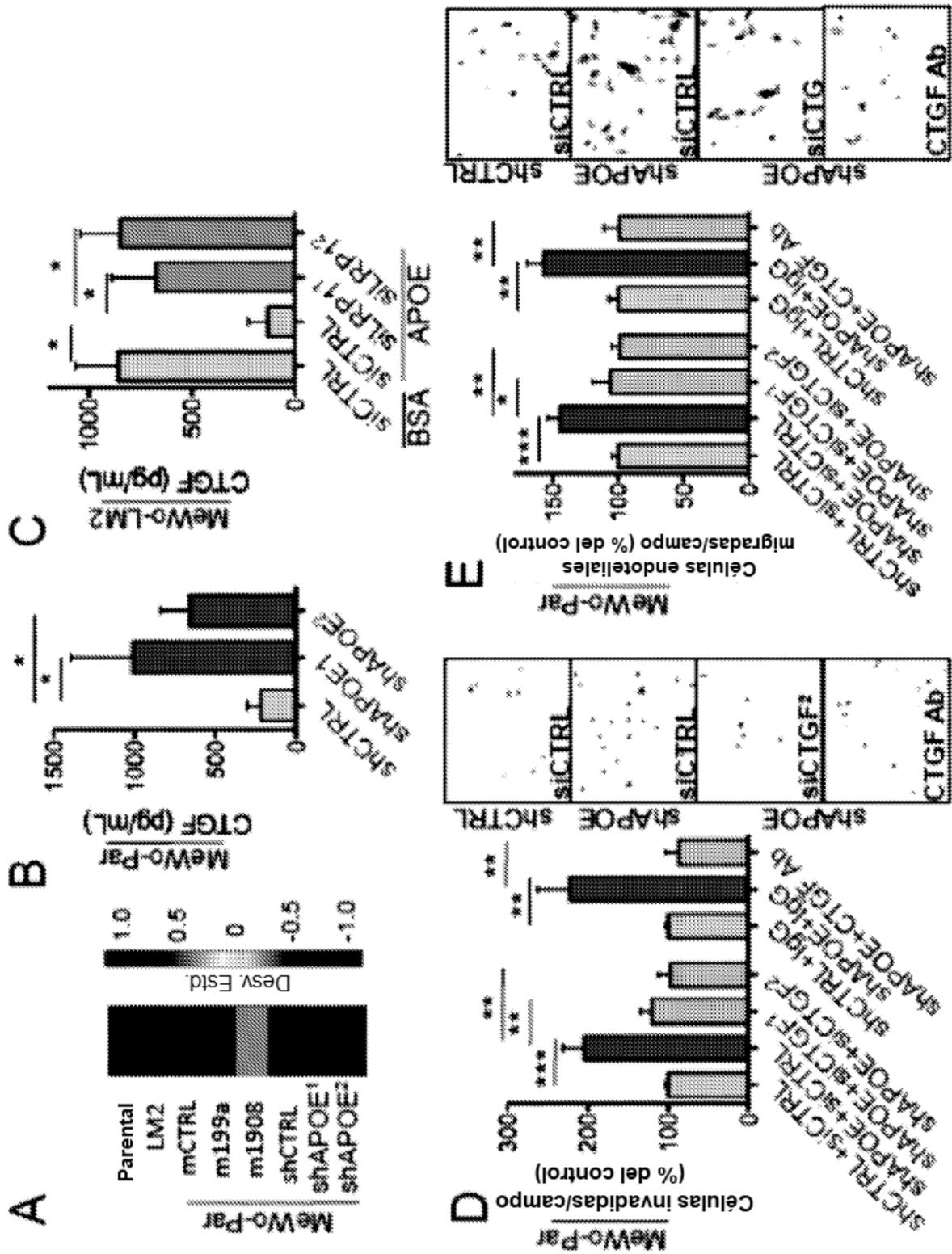
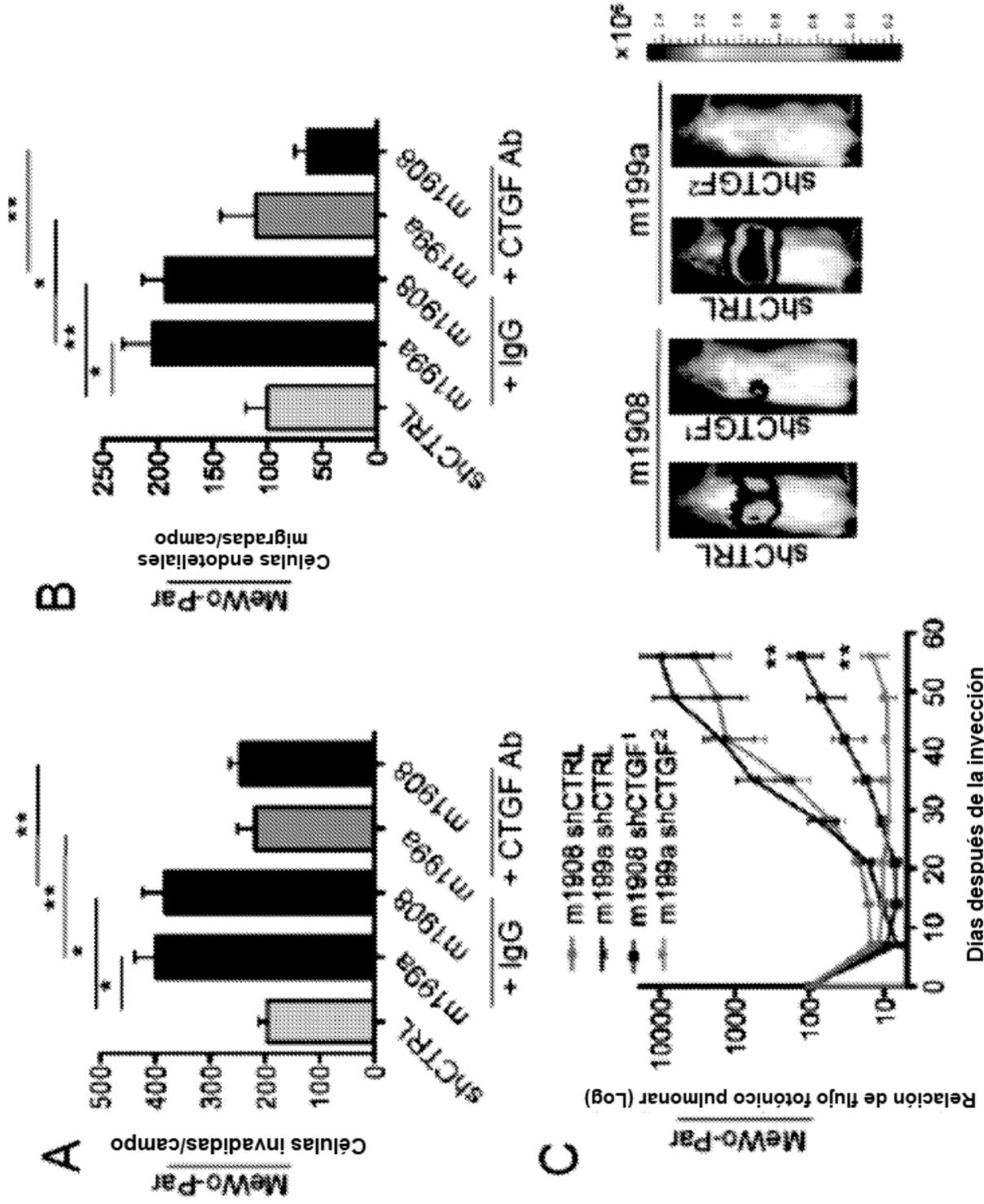


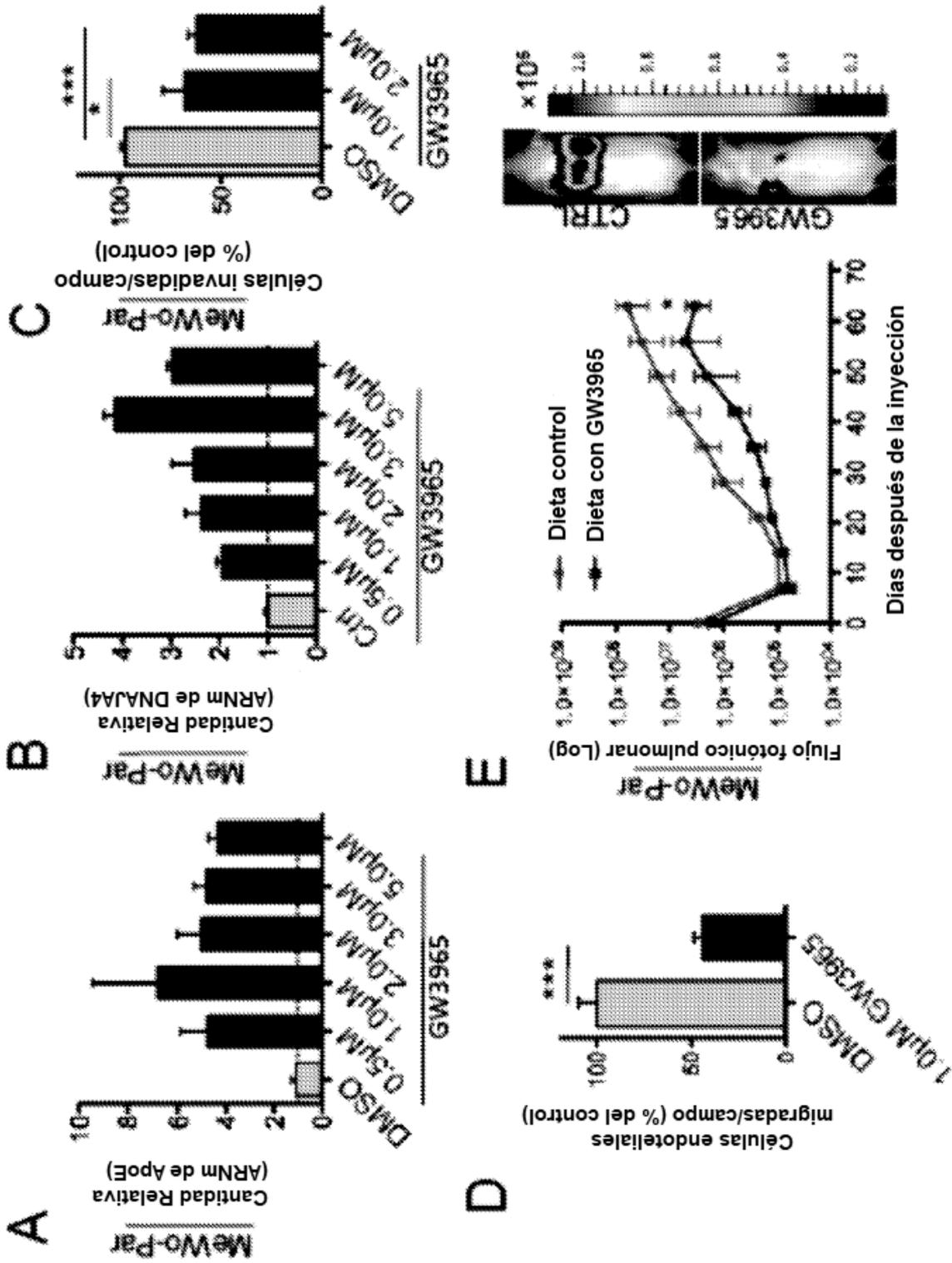
FIGURA 7K

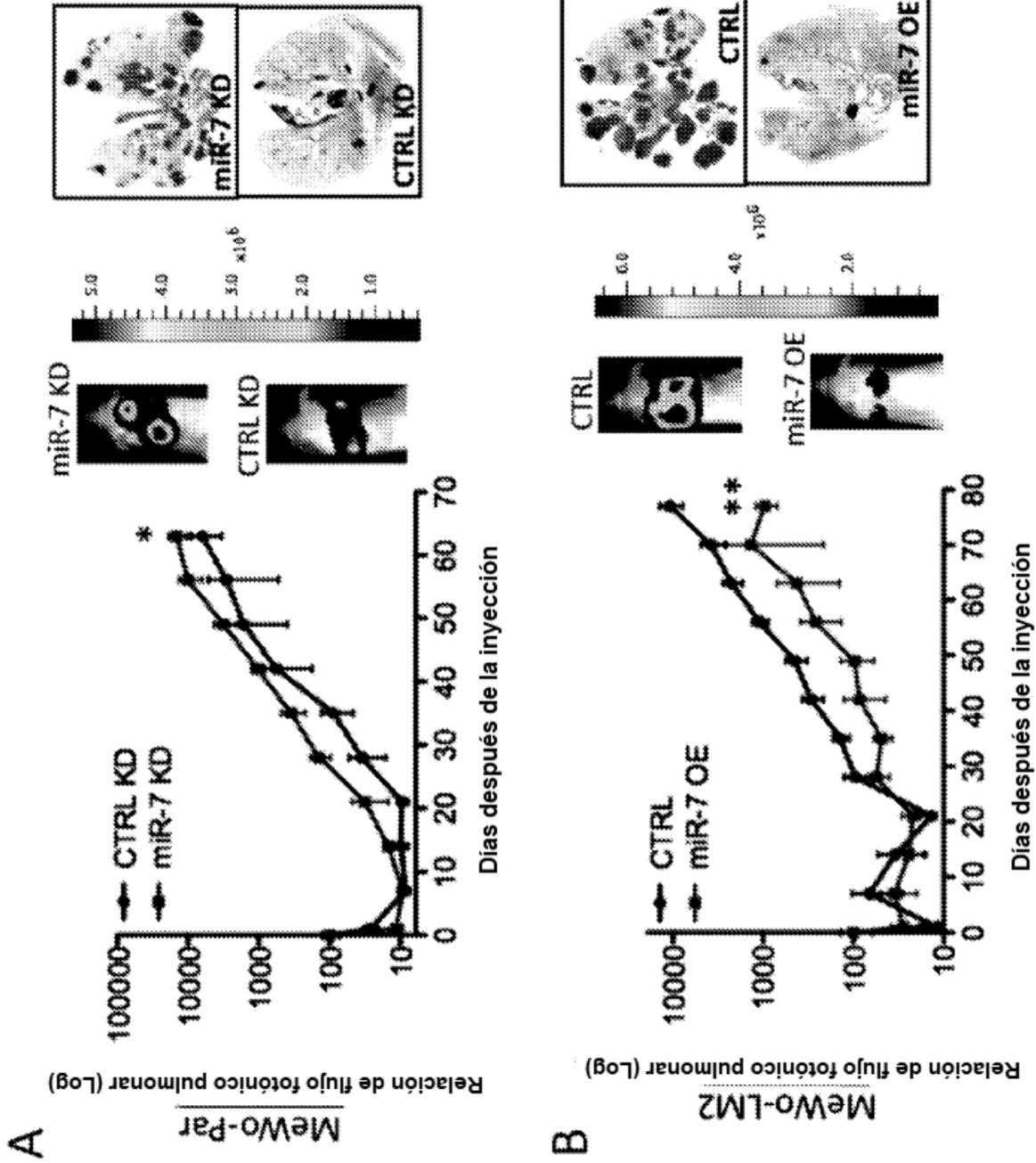


FIGURAS 8A-E

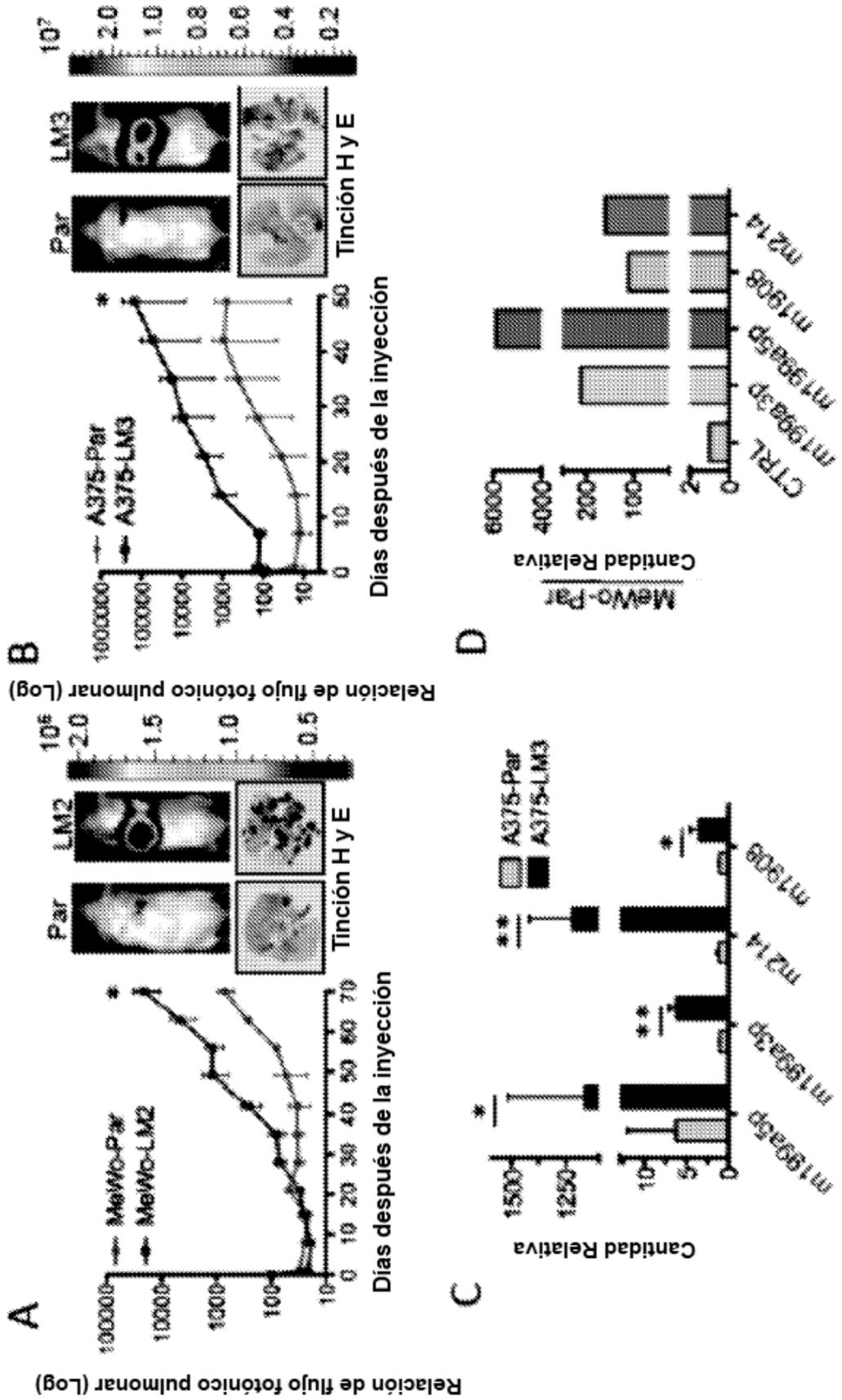


FIGURAS 9A-C

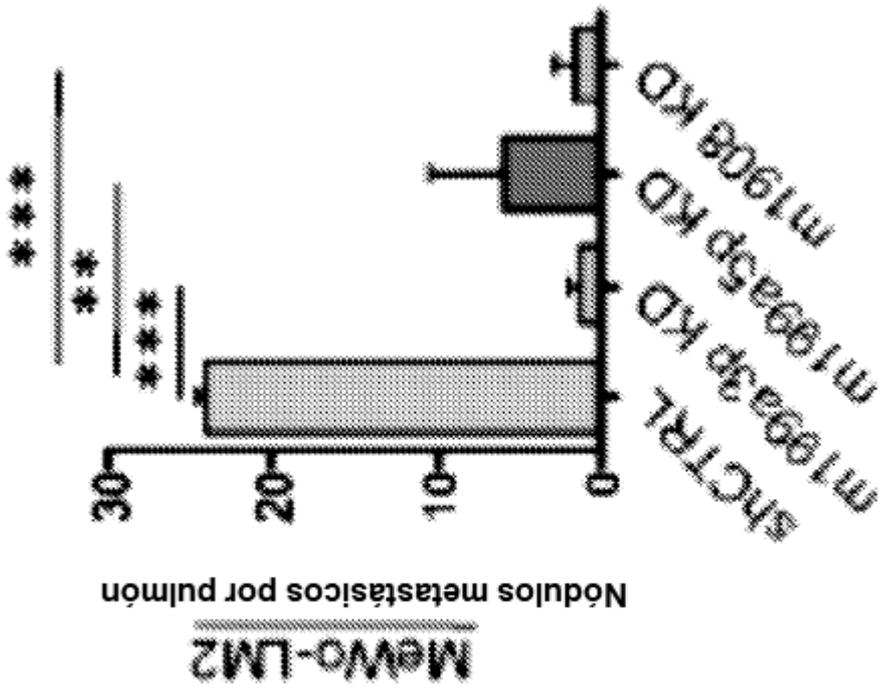




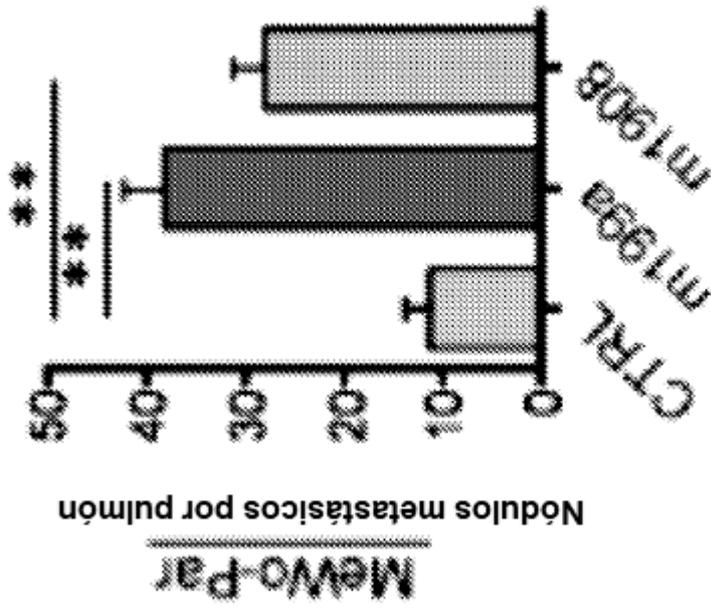
FIGURAS 11A-B



FIGURAS 12A-D

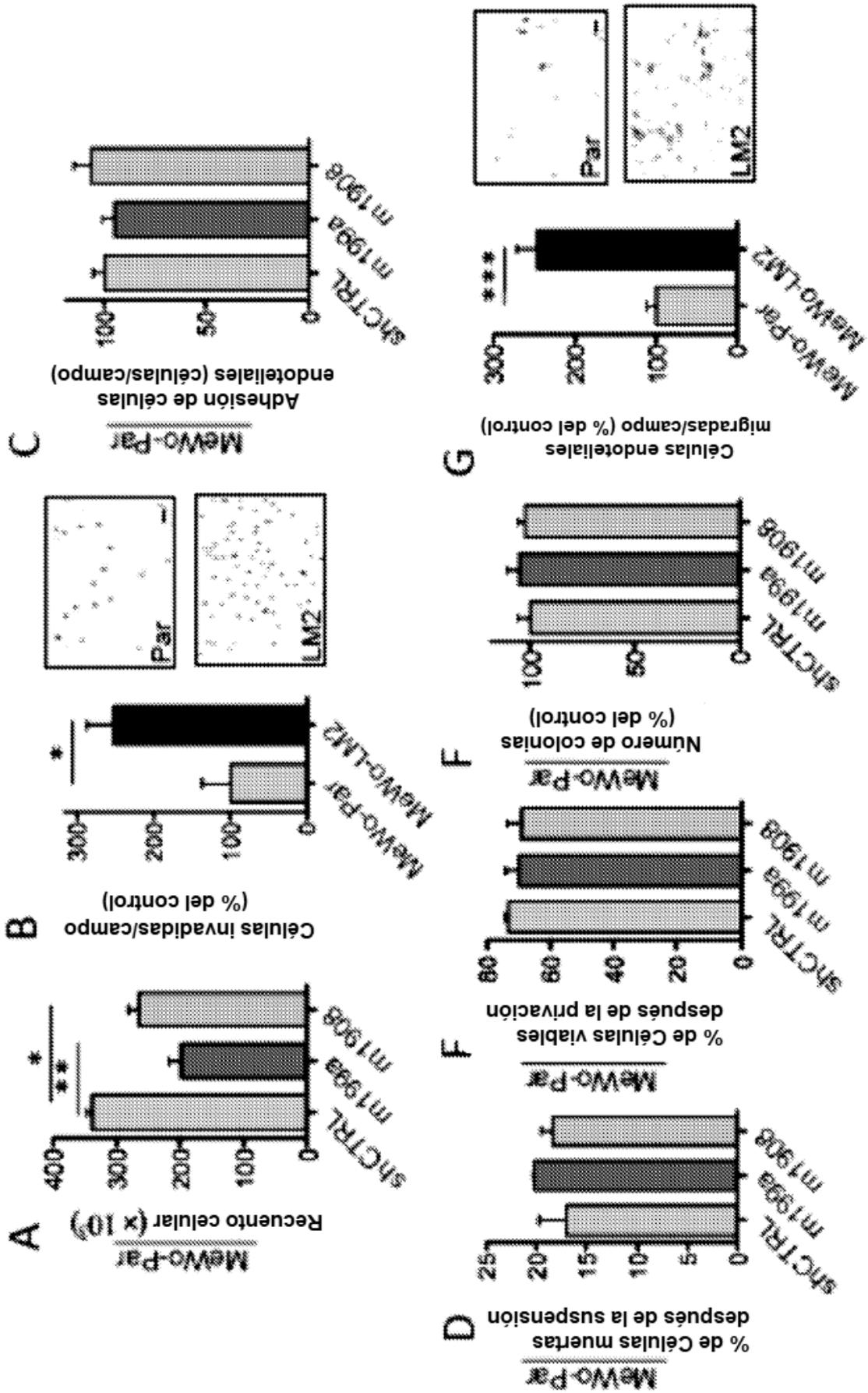


F



E

FIGURAS 12E-F



FIGURAS 13A-G

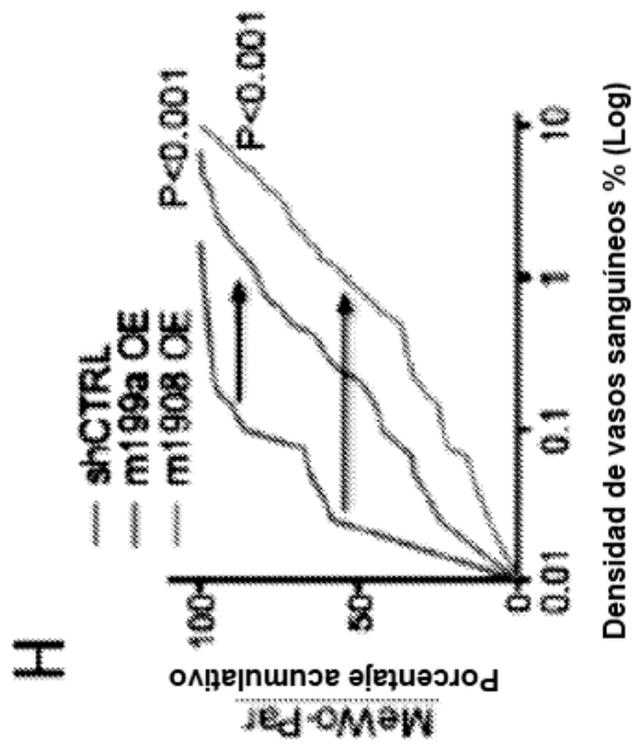
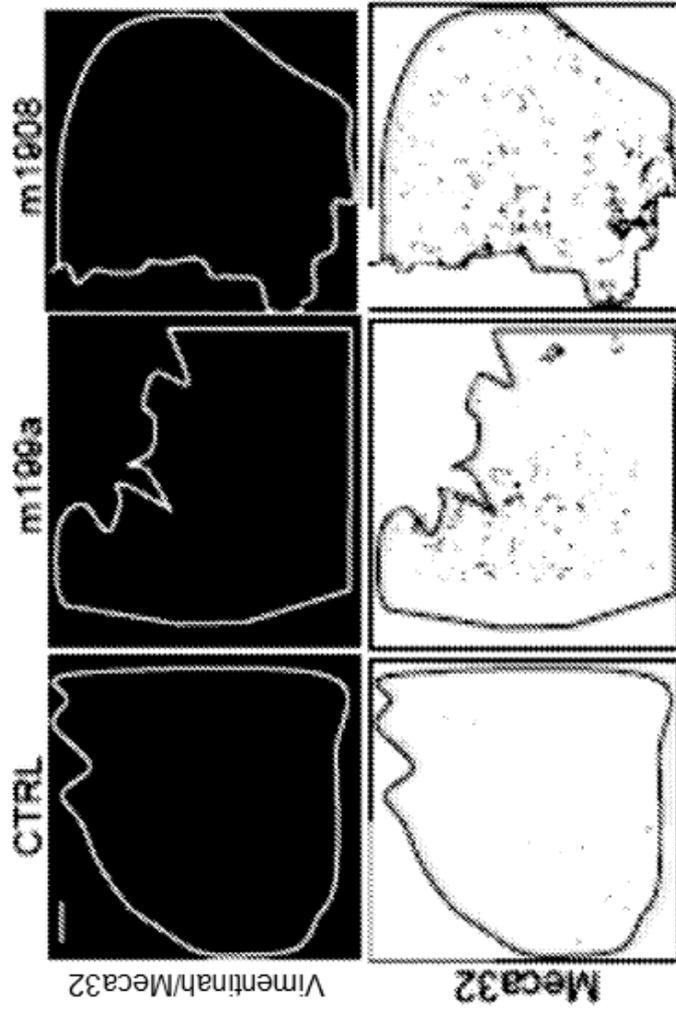
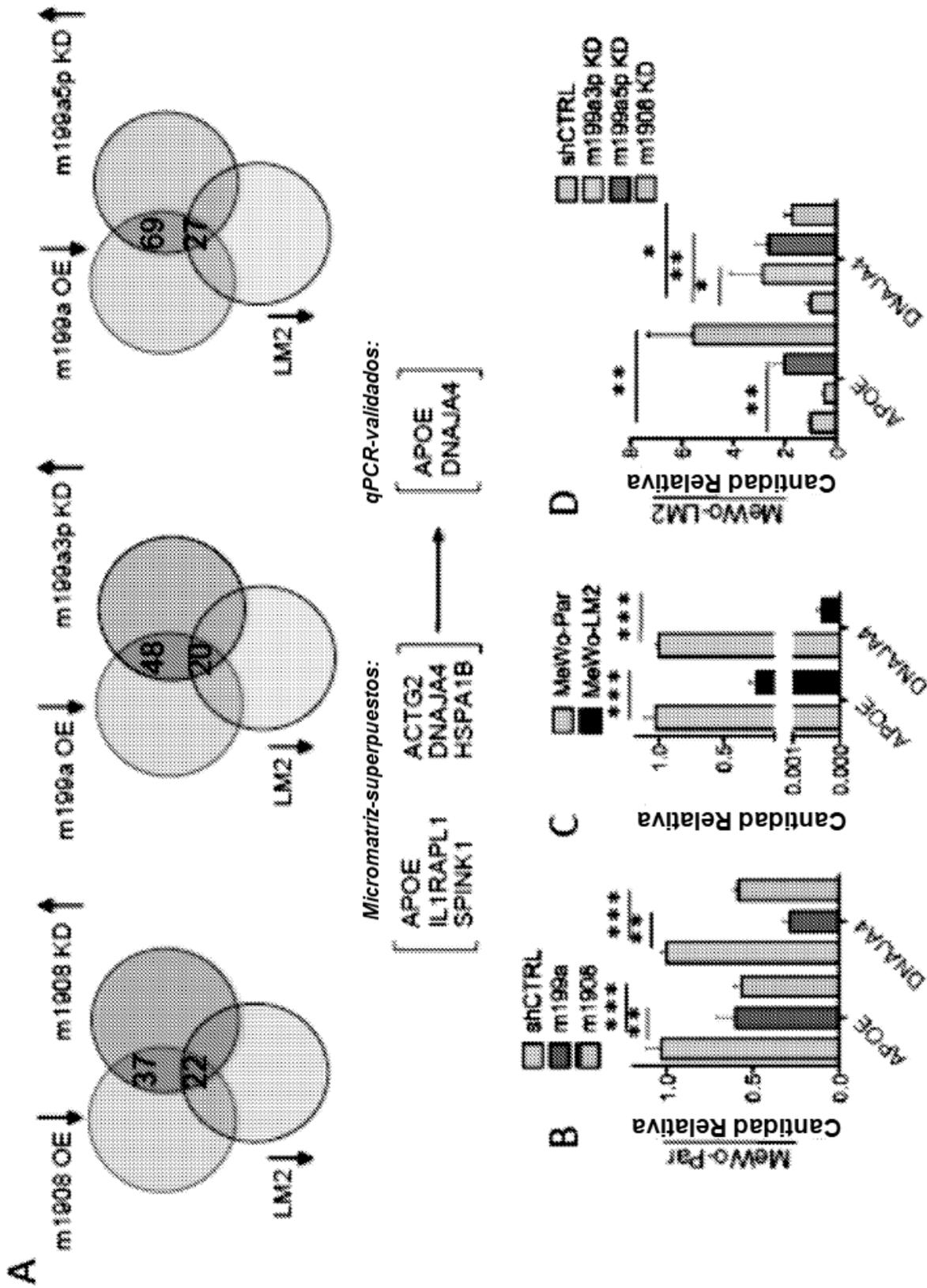
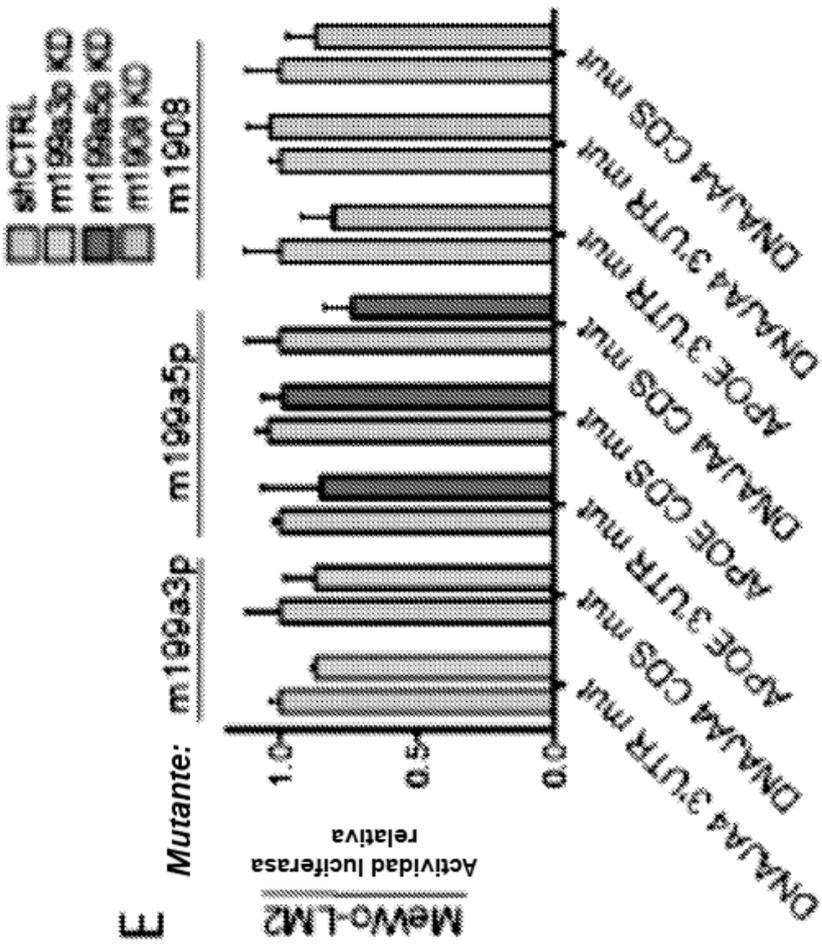
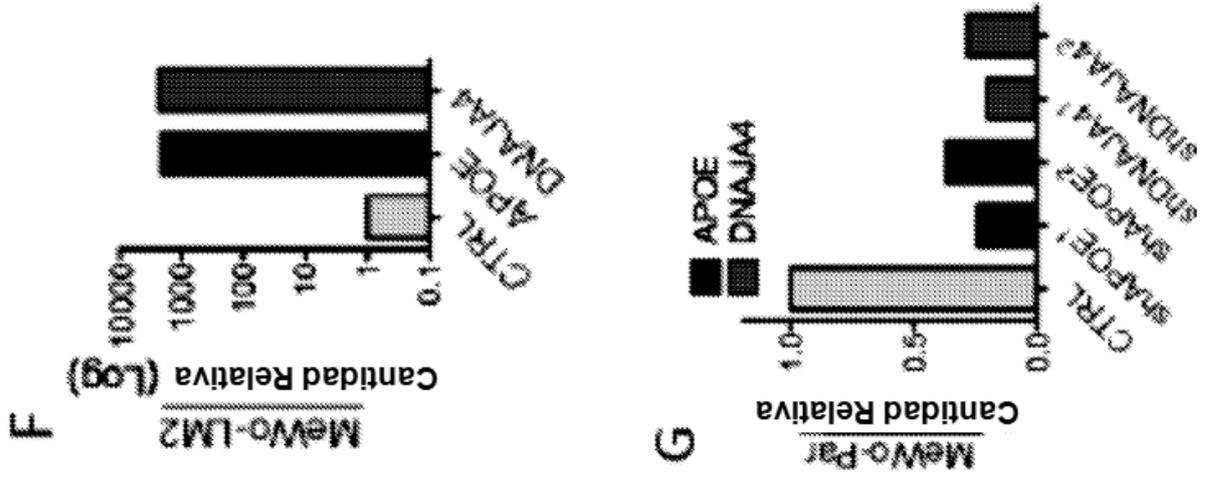


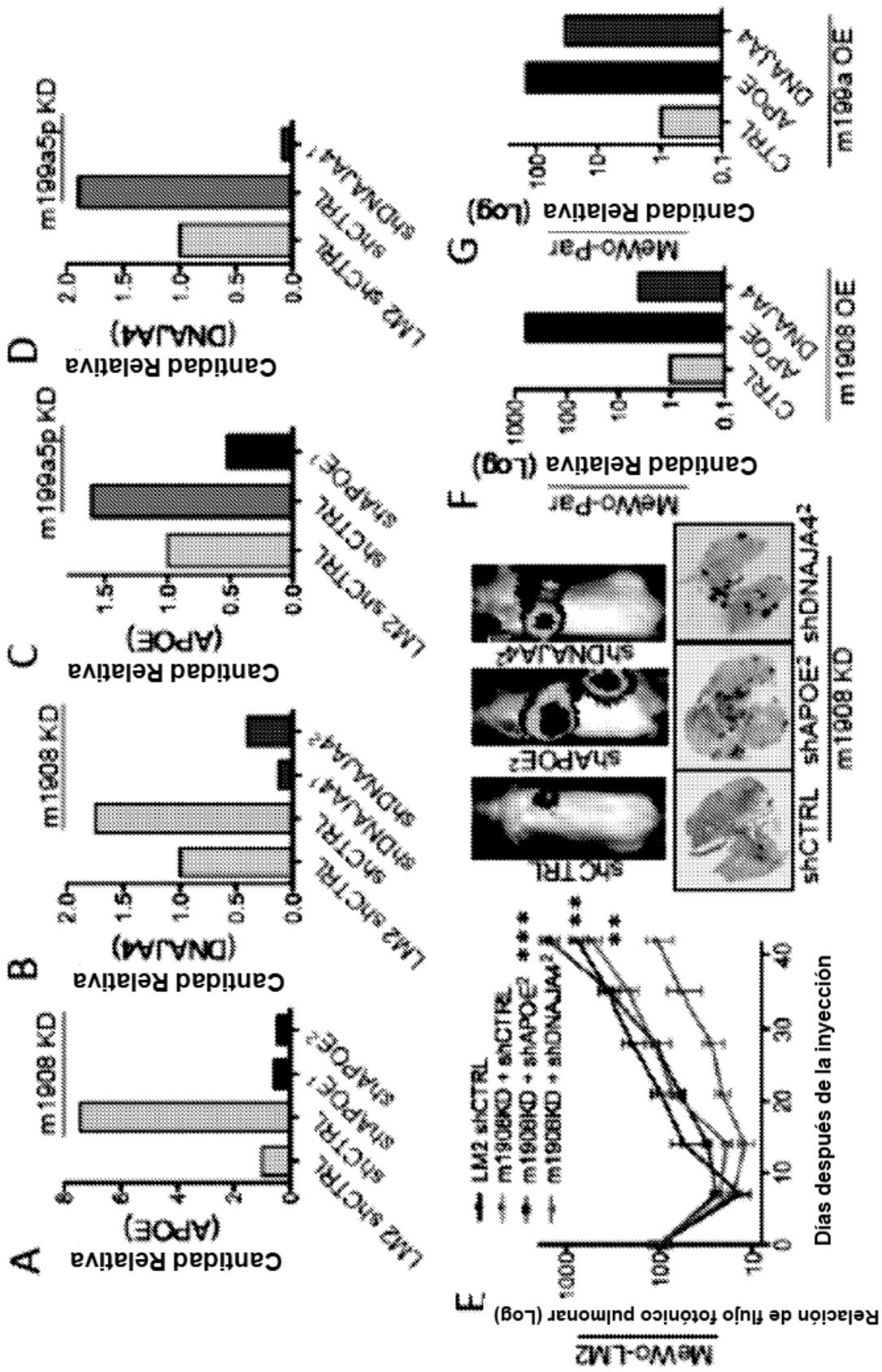
FIGURA 13H



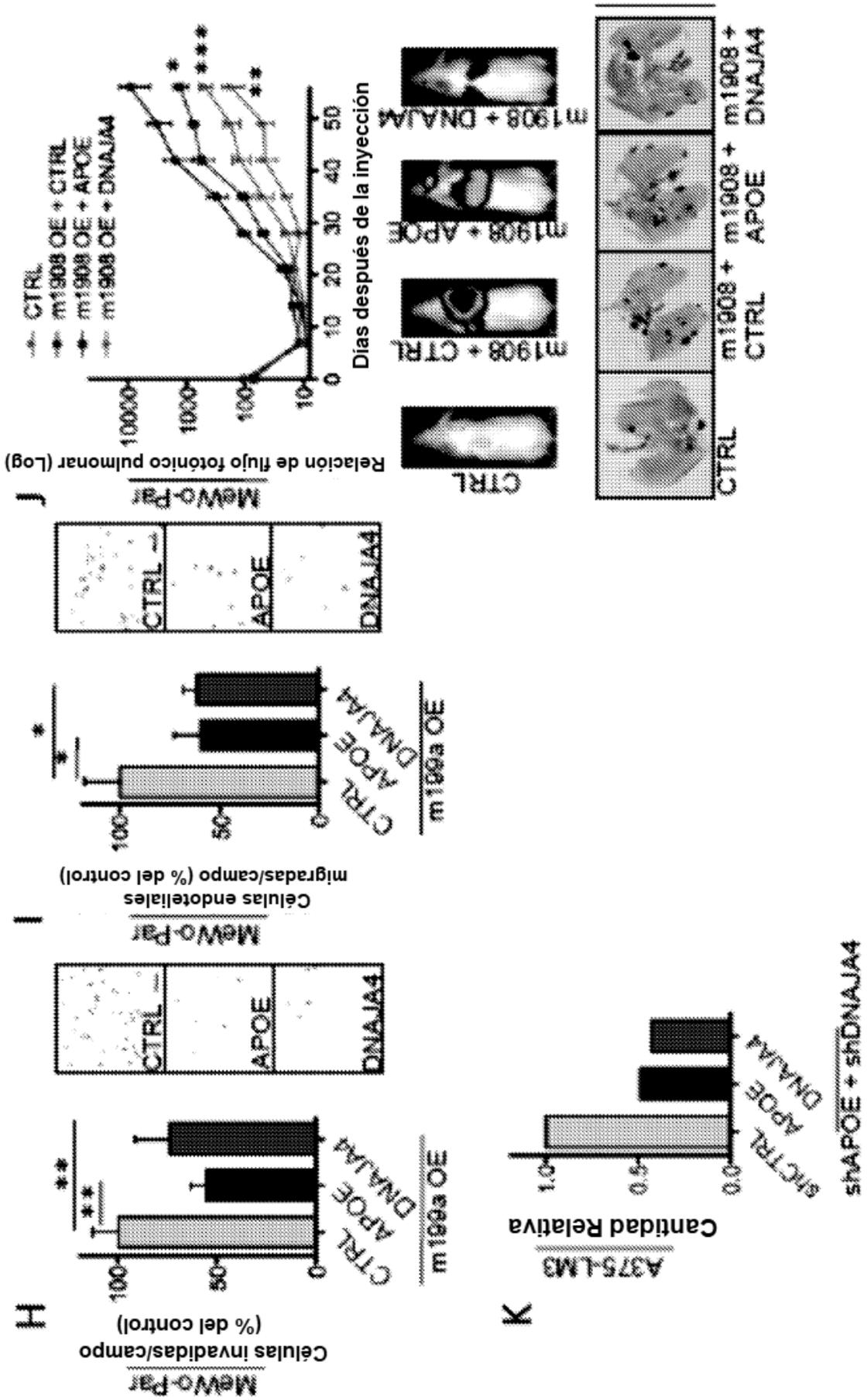
FIGURAS 14A-D

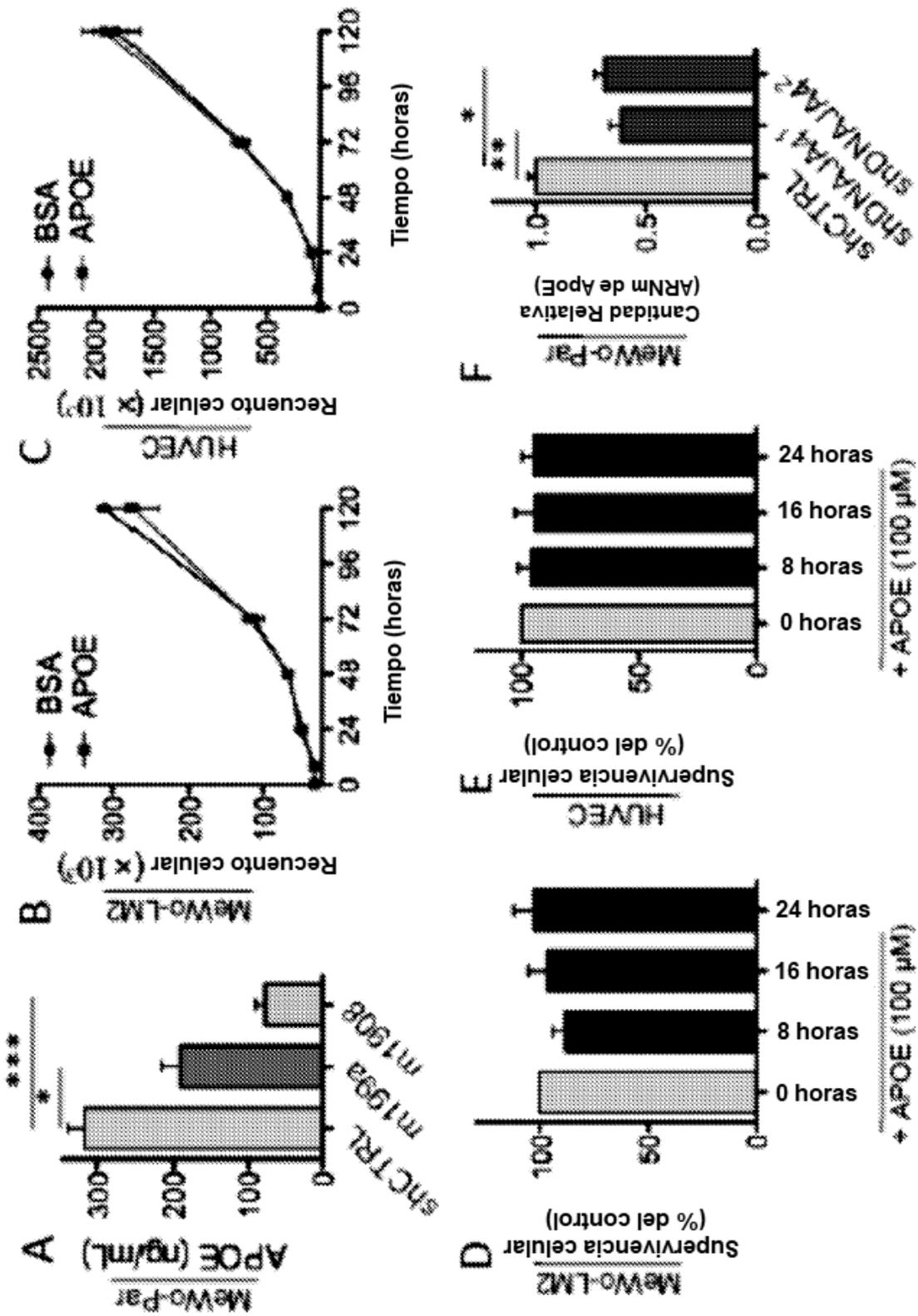


FIGURAS 14E-G

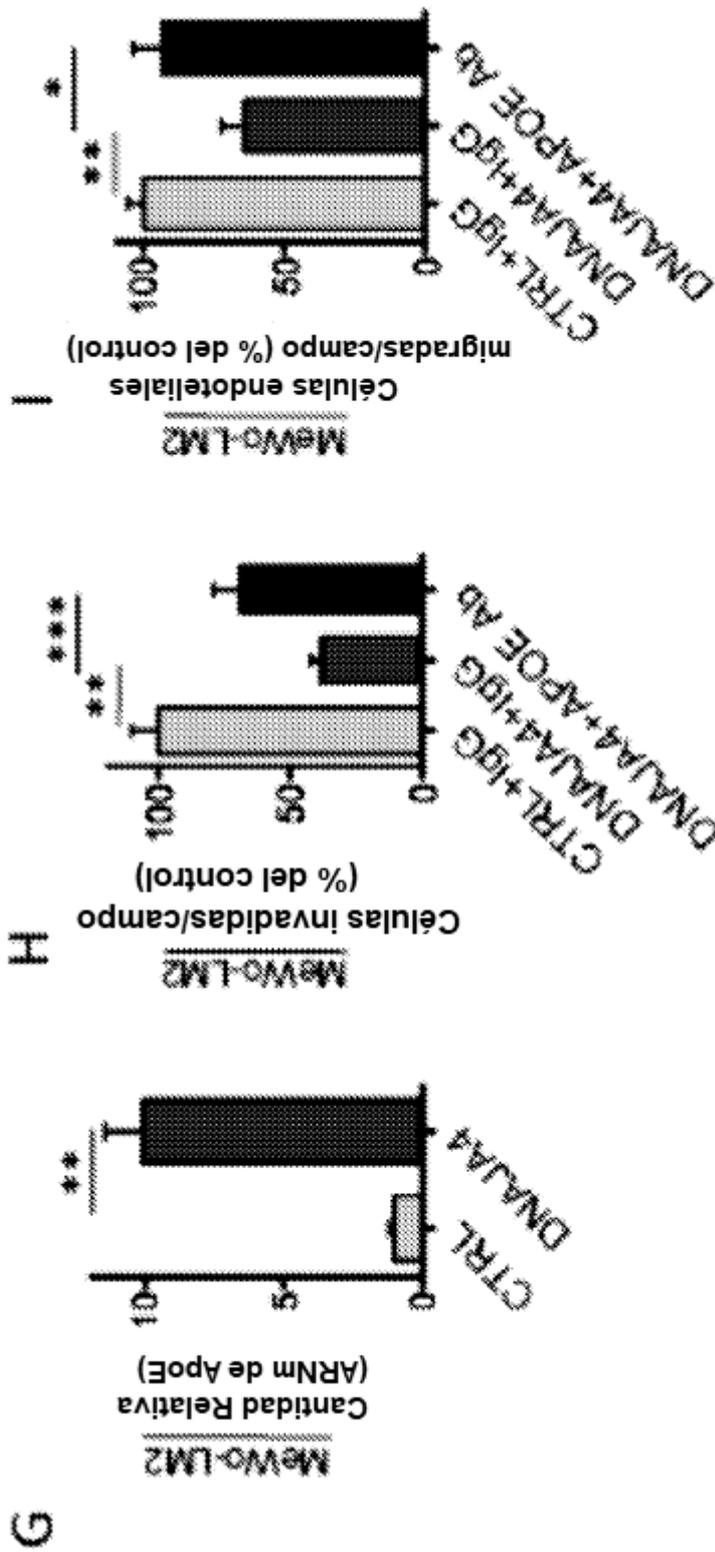


FIGURAS 15A-G

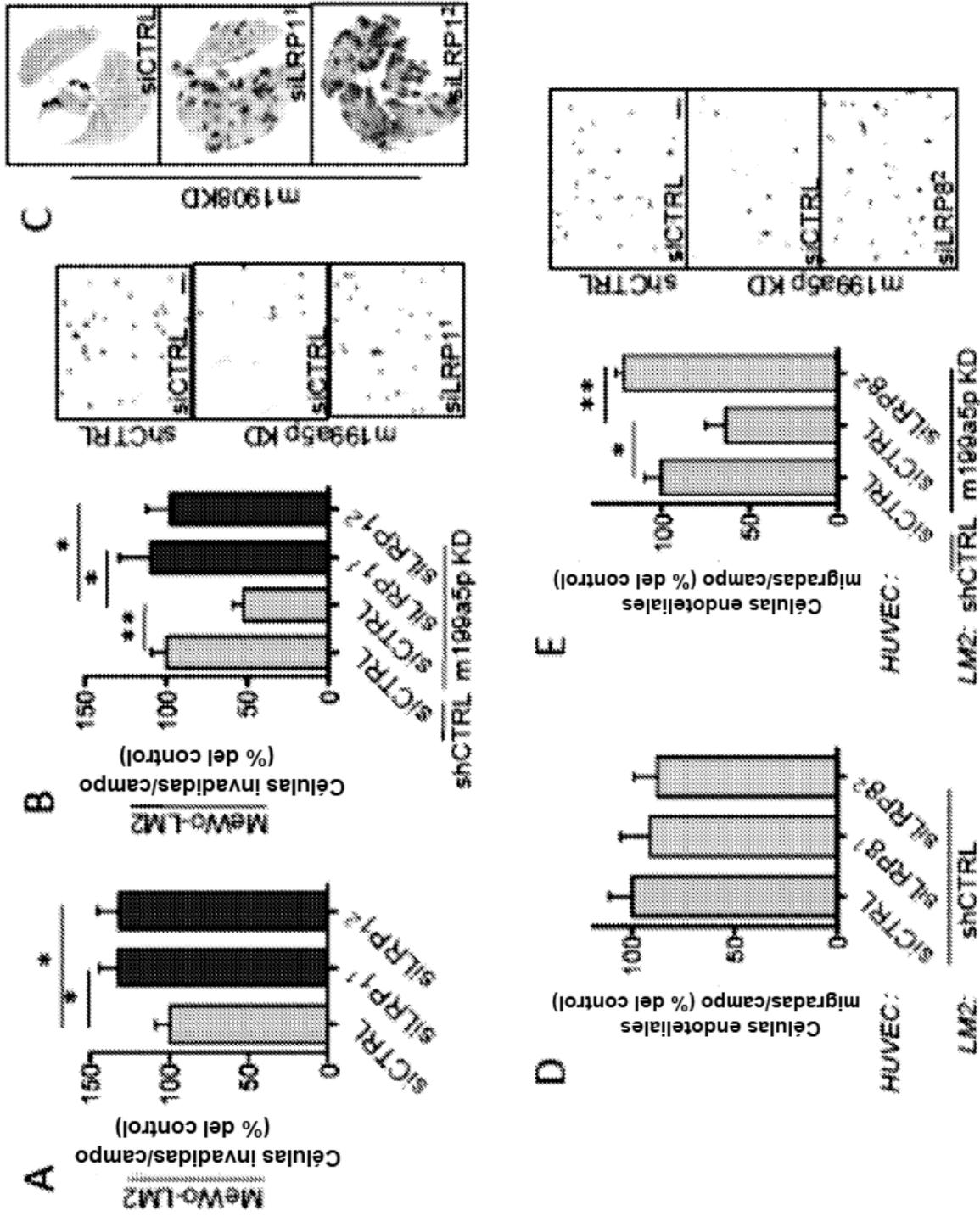




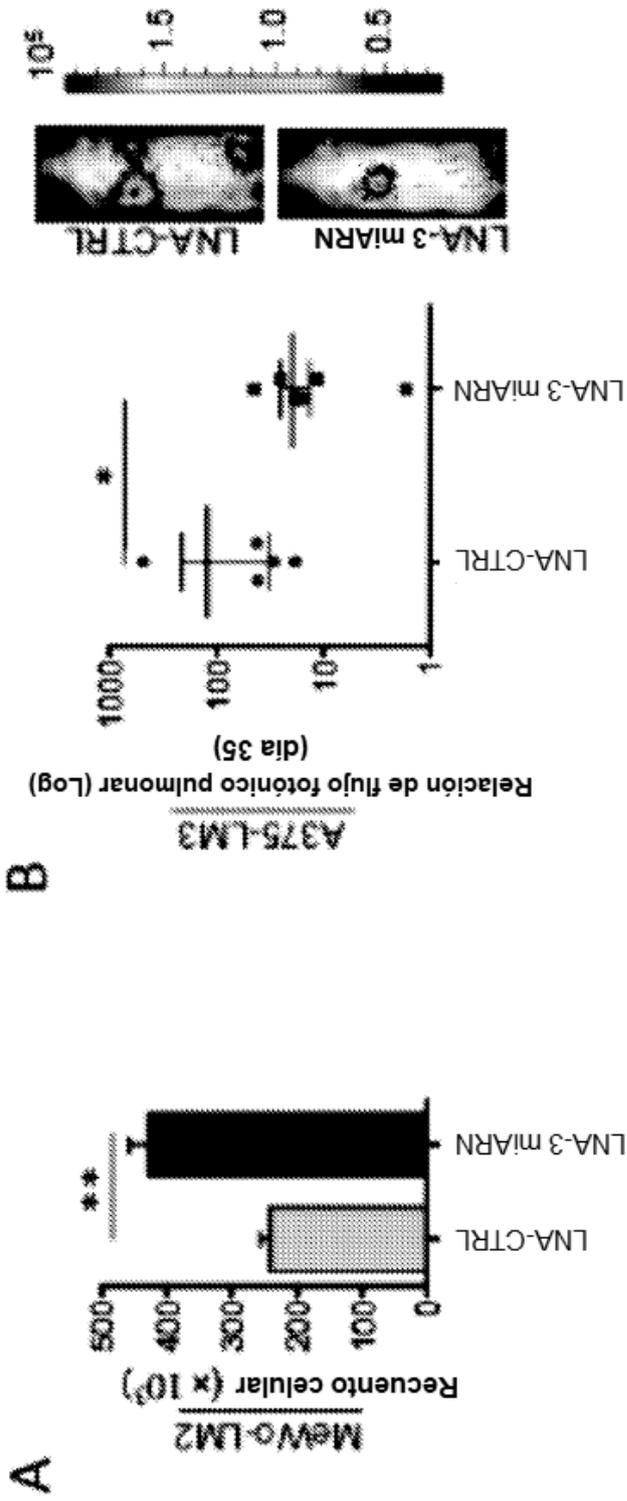
FIGURAS 16A-F



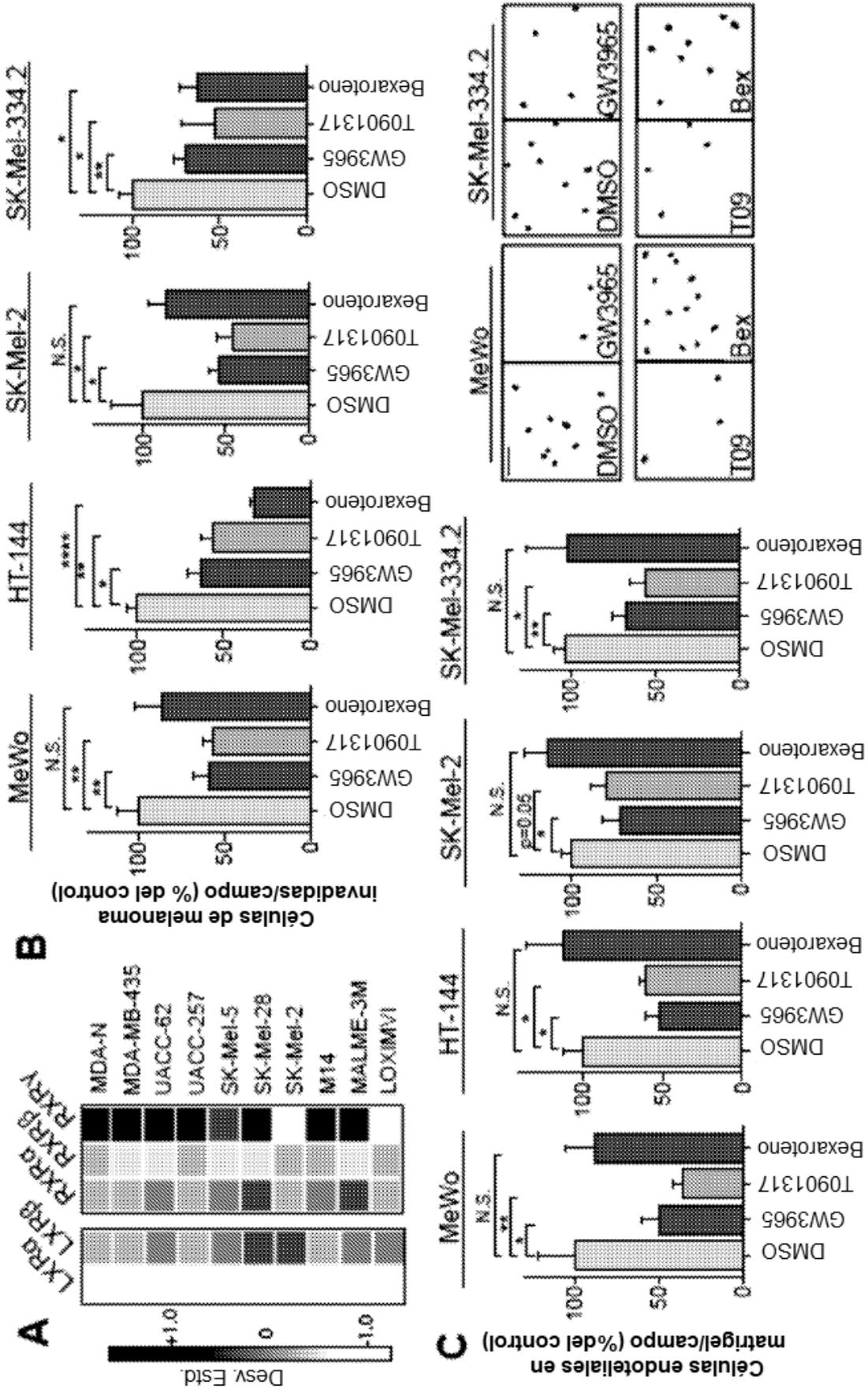
FIGURAS 16G-I



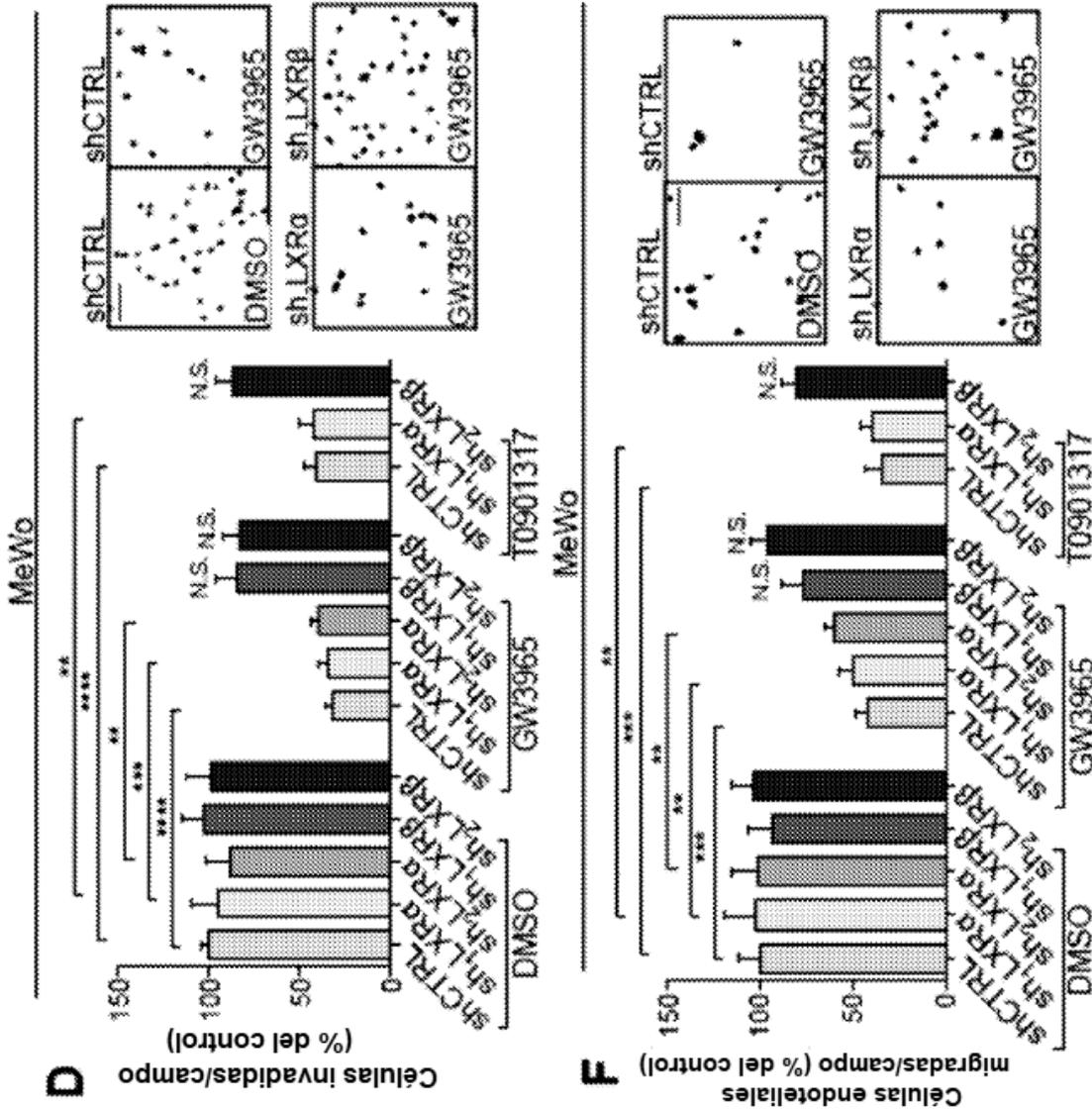
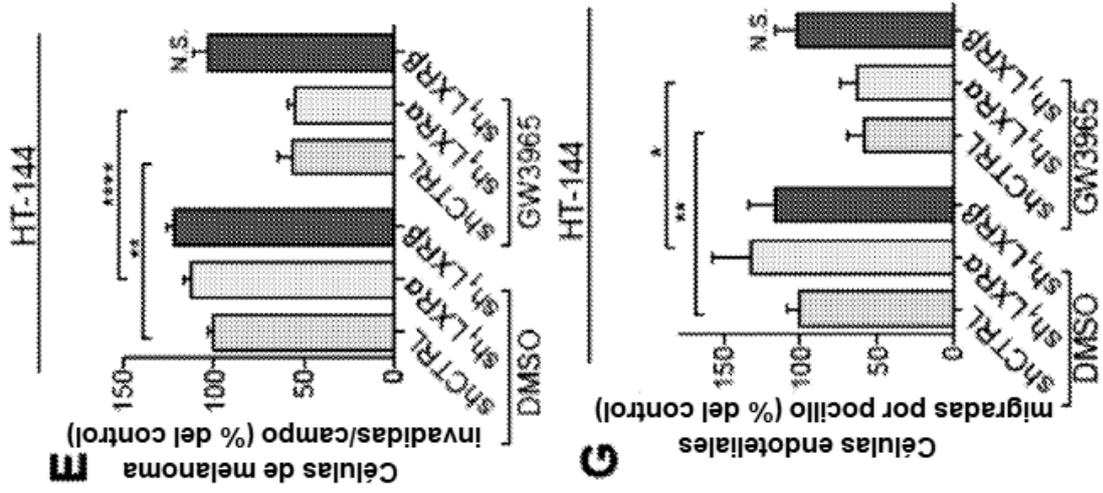
FIGURAS 17A-E



FIGURAS 18A-C



FIGURAS 19A-C



FIGURAS 19D-F

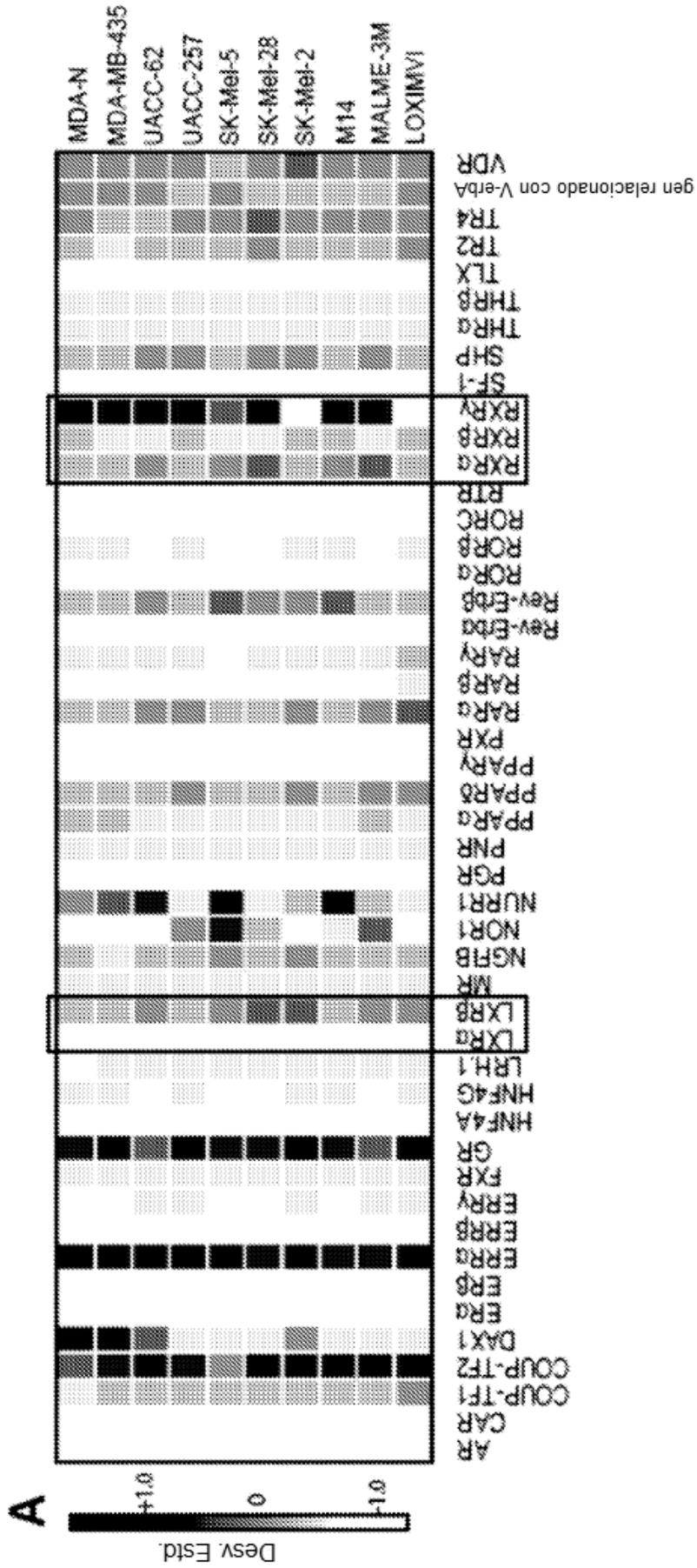
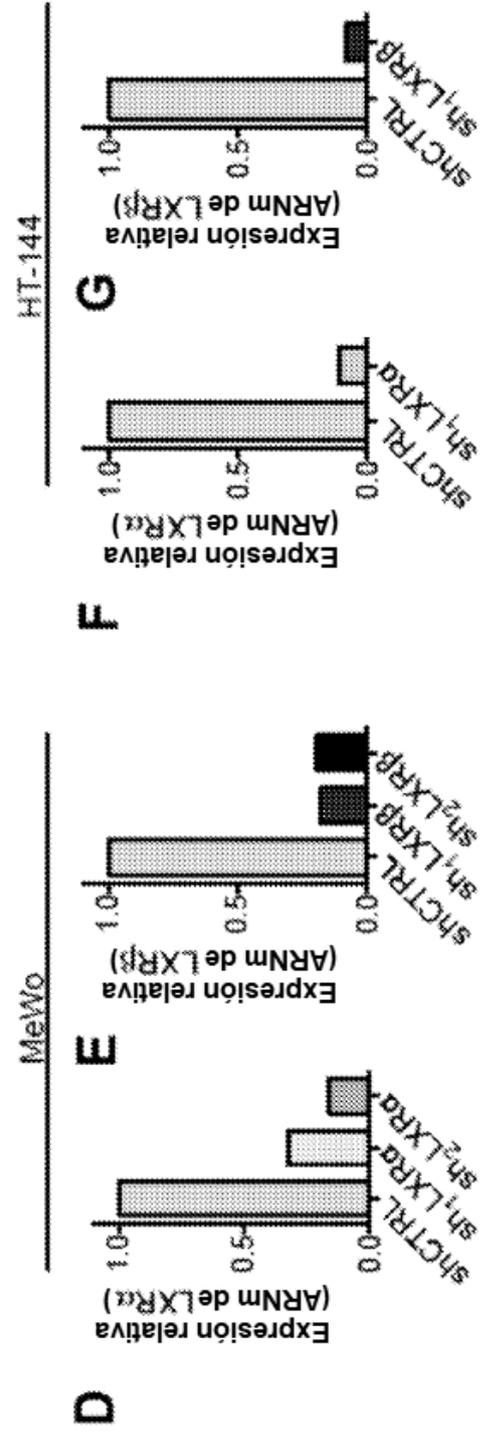
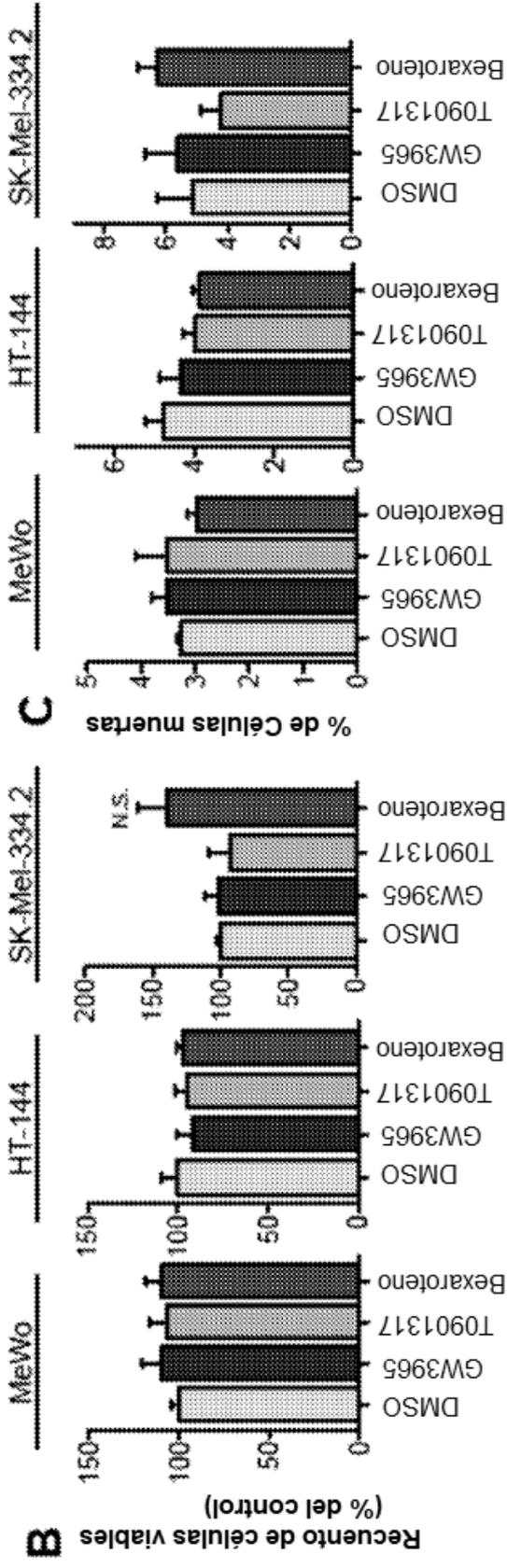
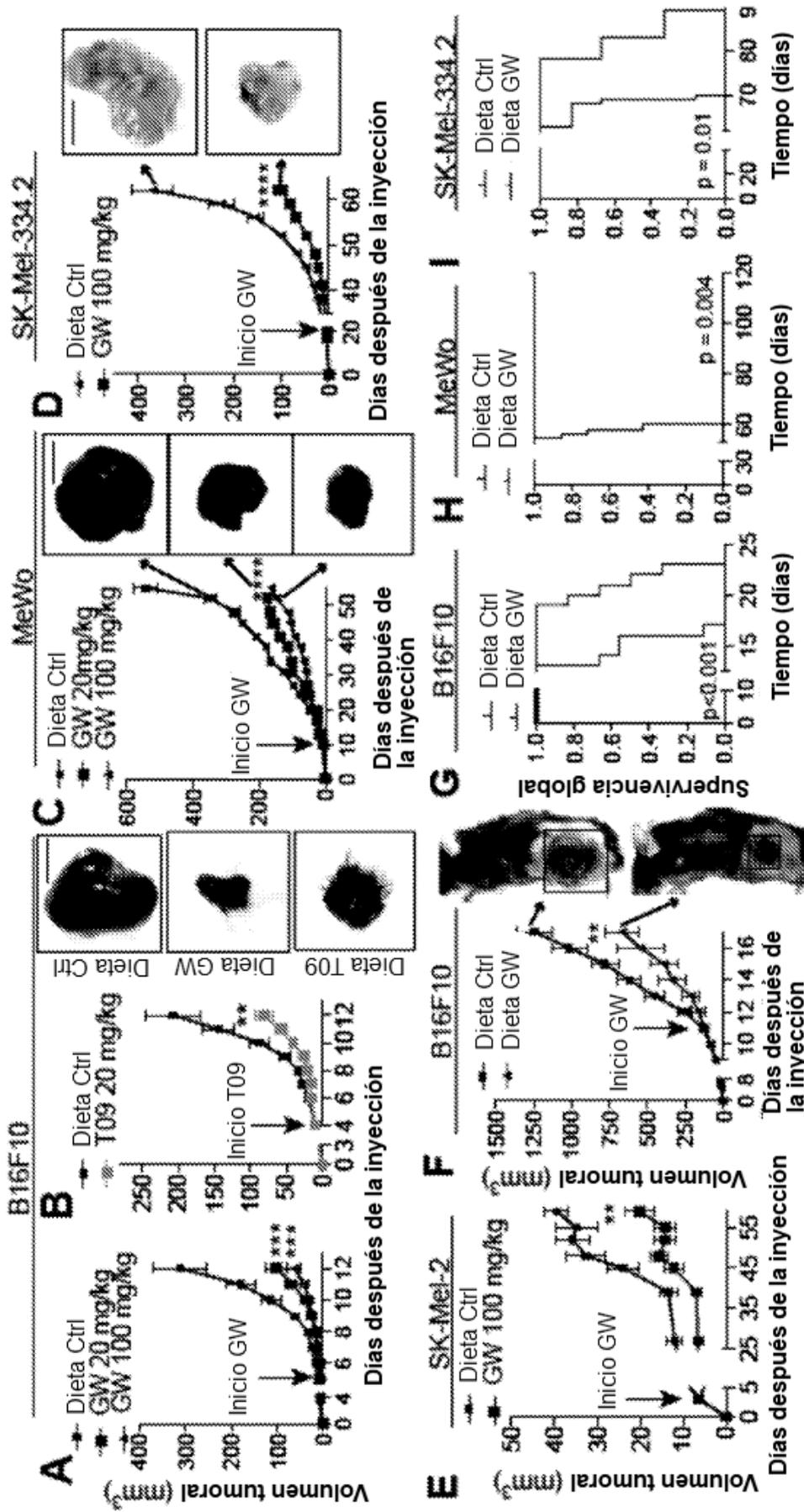


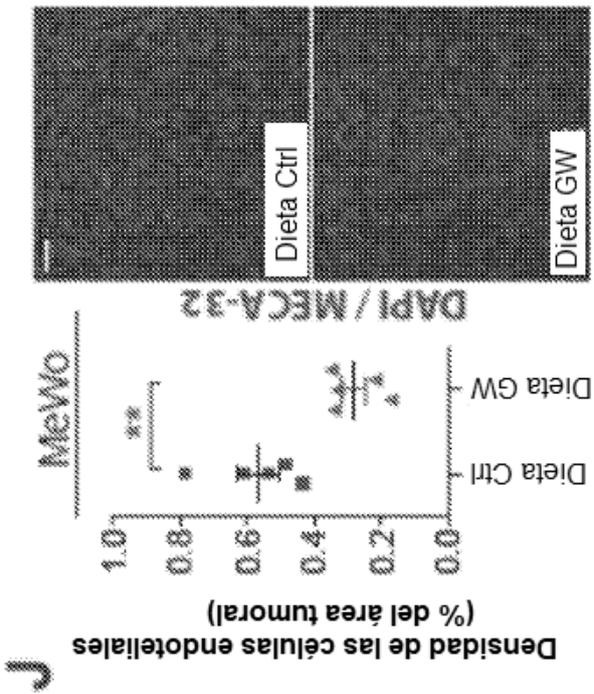
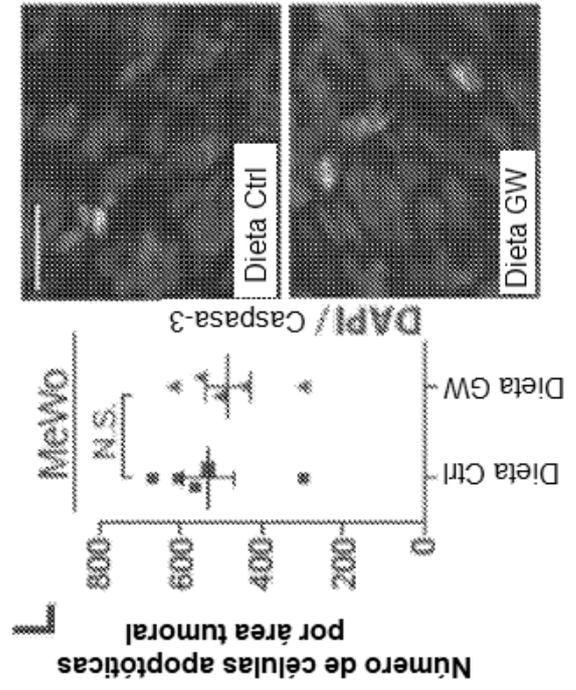
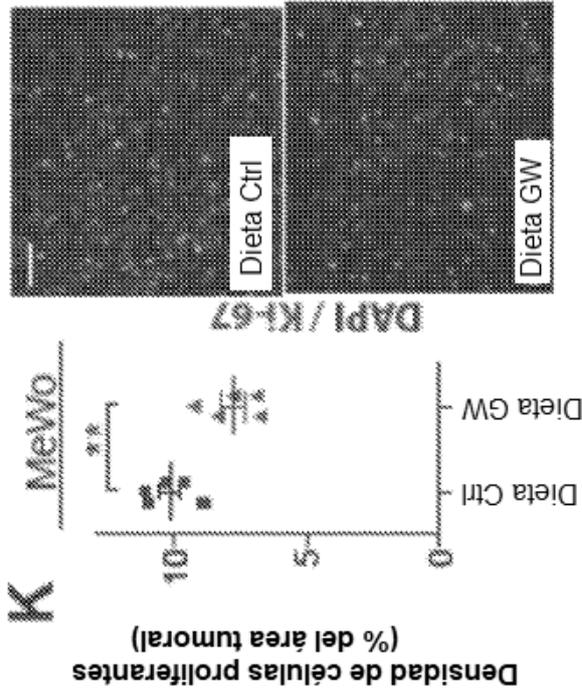
FIGURA 20A



FIGURAS 20B-G



FIGURAS 21A-I



FIGURAS 21J-L

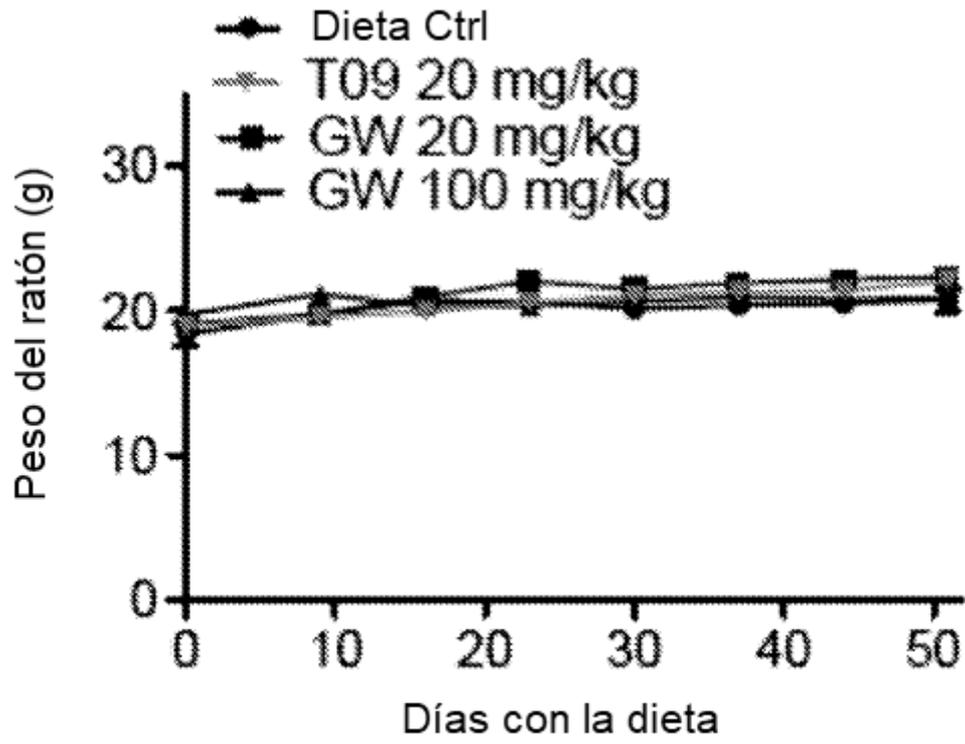
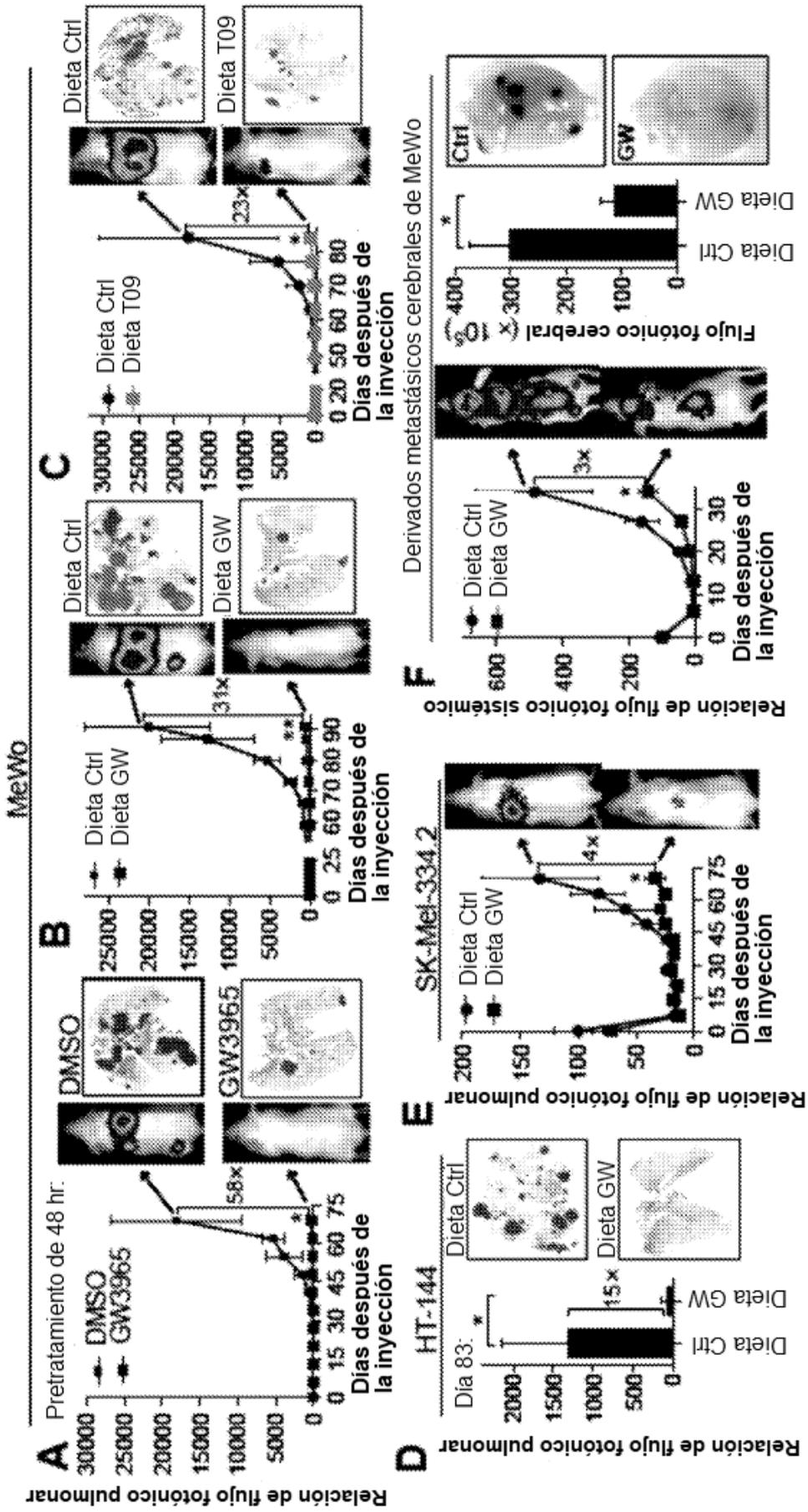
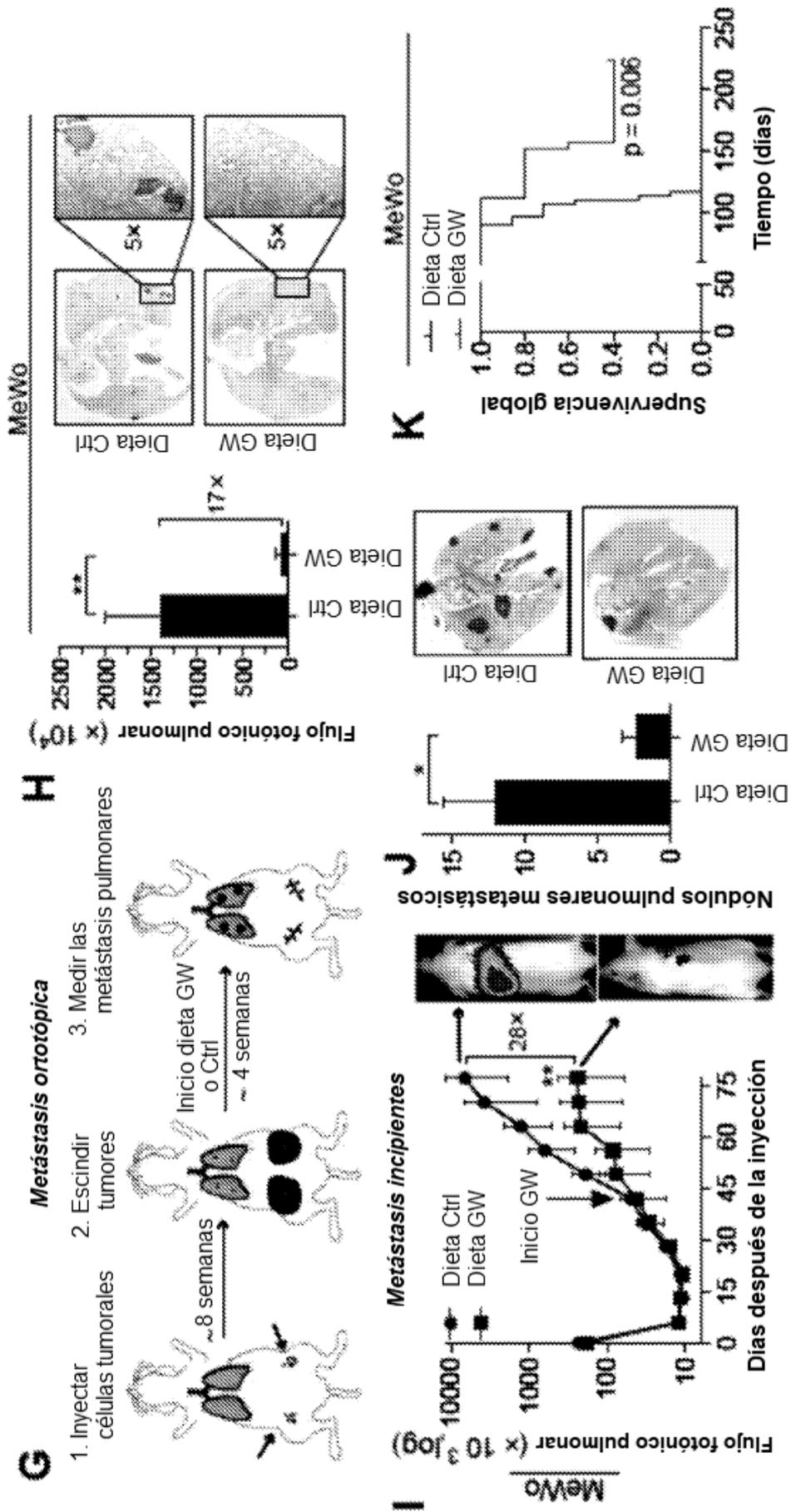


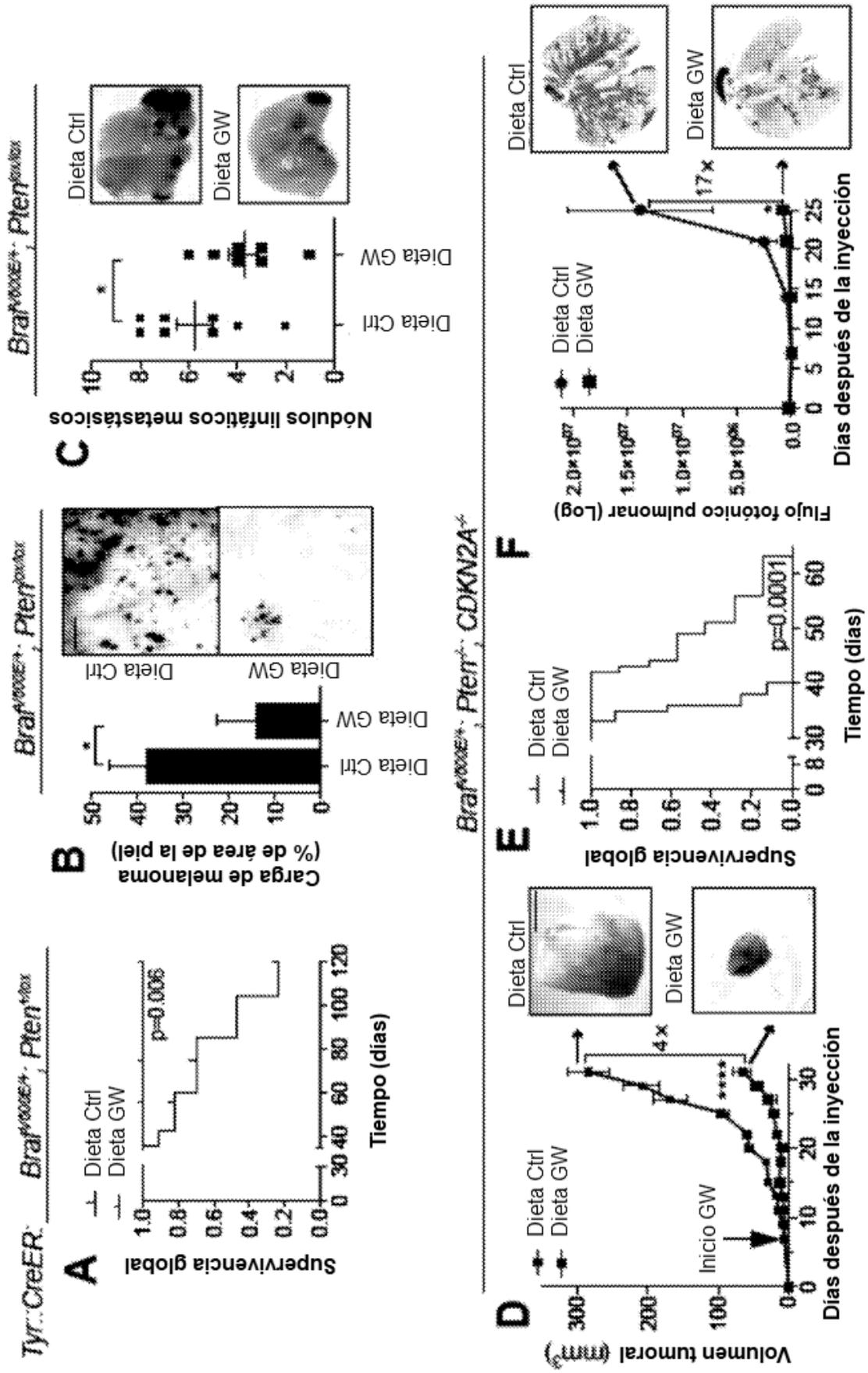
FIGURA 22



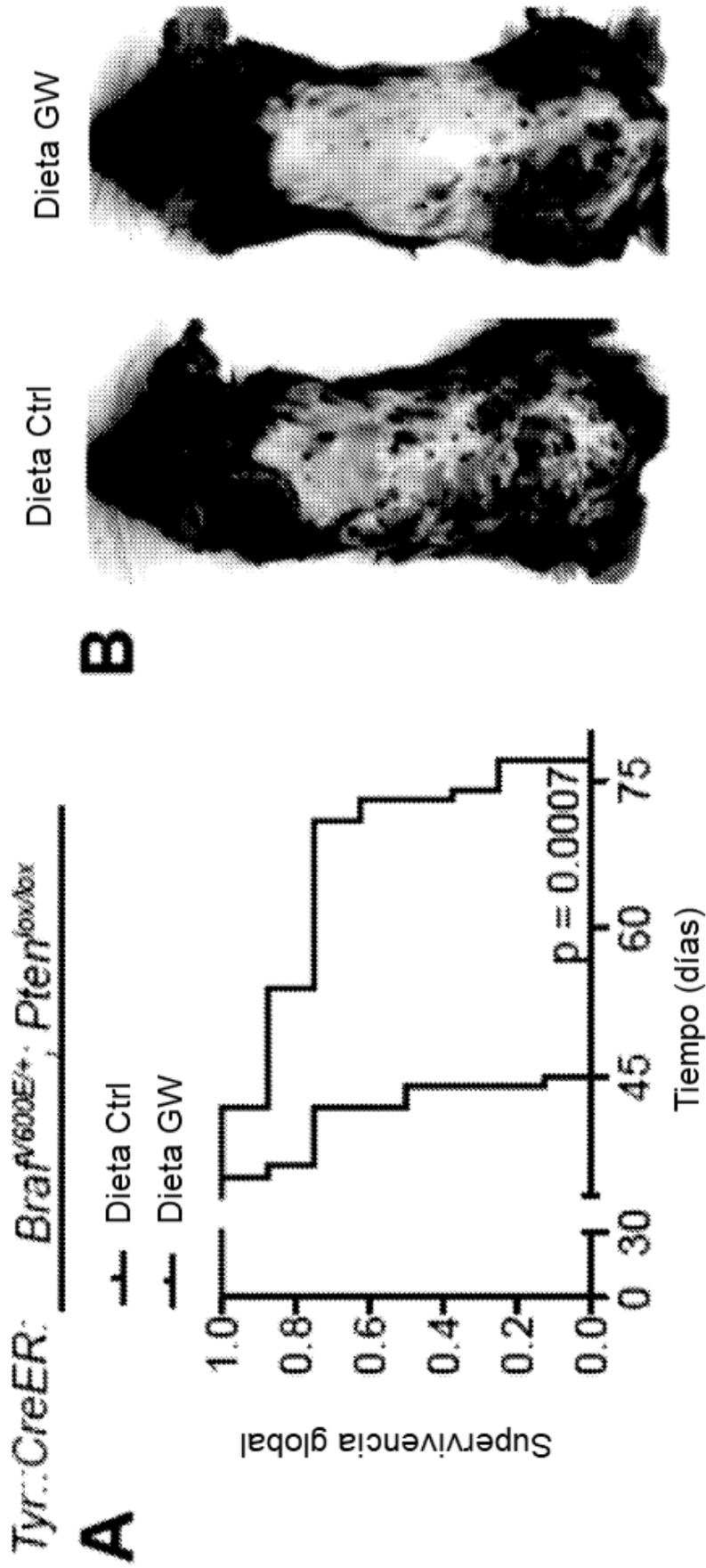
FIGURAS 23A-F



FIGURAS 23G-K



FIGURAS 24A-F



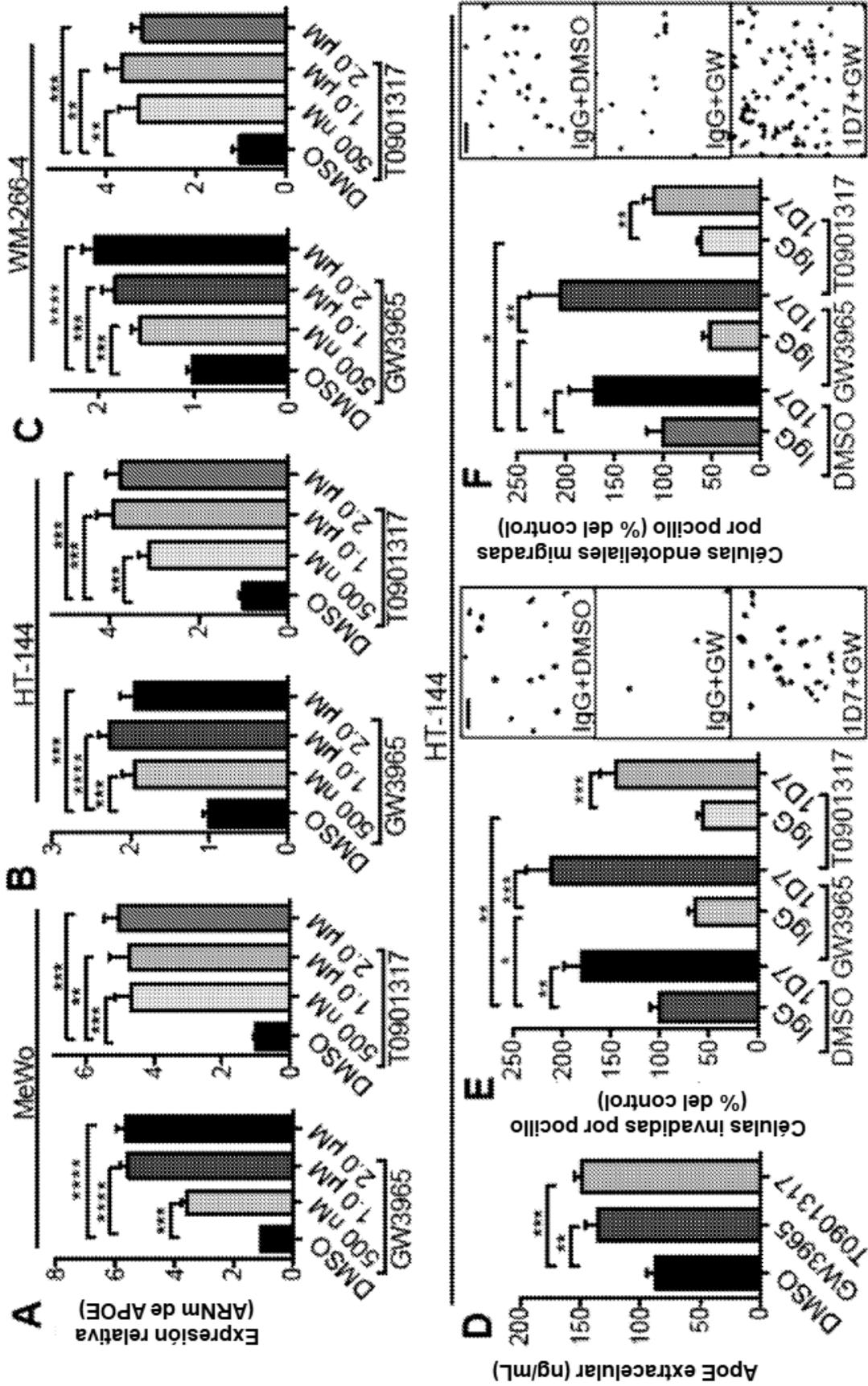
FIGURAS 25A-B

Tabla S1 Lista de los 50 genes más regulados al alza en células de melanoma humano MeWo en respuesta a tratamiento con GW3965

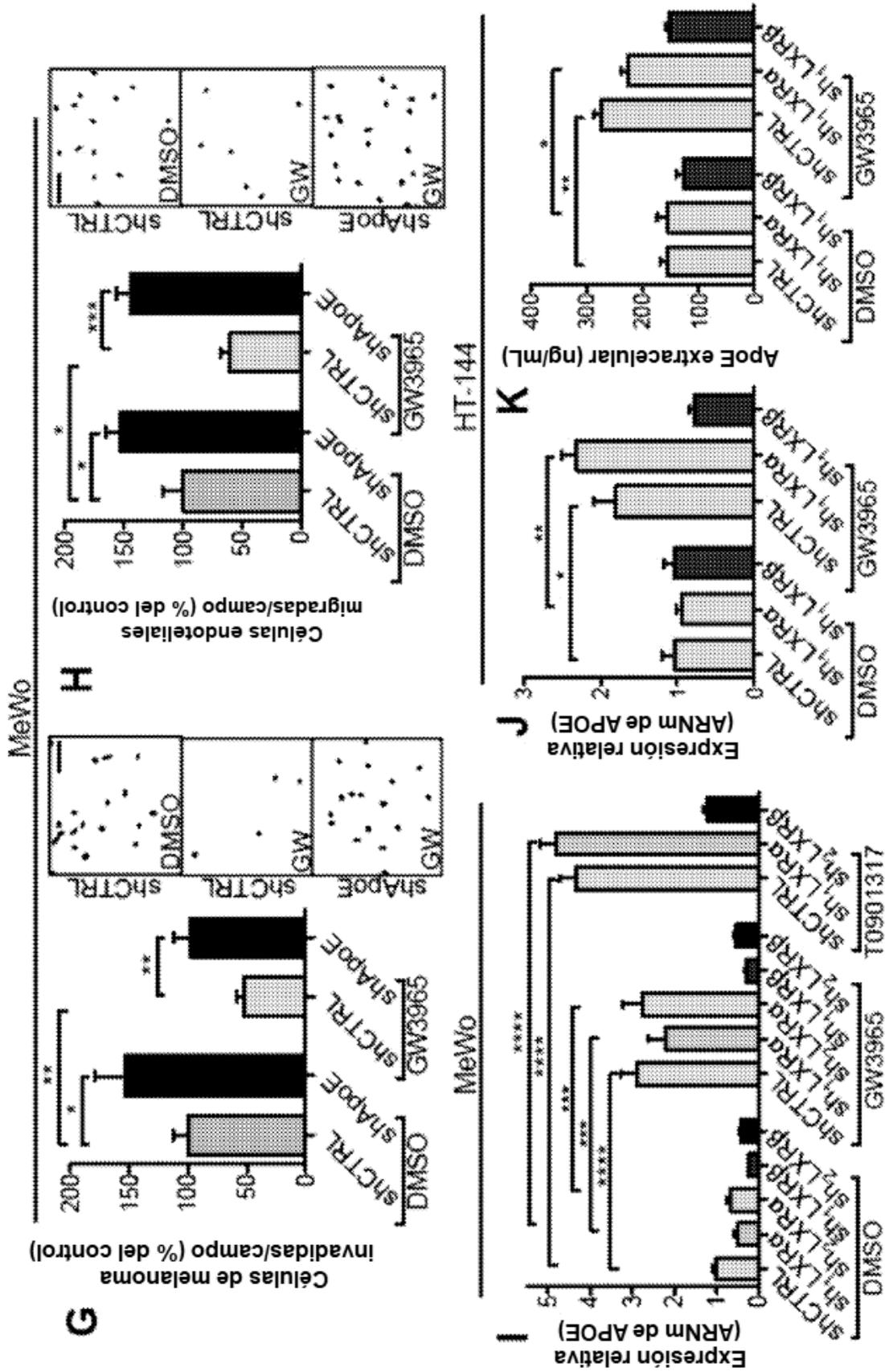
ID del Gen	Veces de cambio*	Valor q	Rango	ID del Gen	Veces de cambio*	Valor q	Rango
ABCA1	19.34	1.98E-11	1	GEACAM1	1.83	5.58E-06	26
SREBF1	8.08	9.12E-15	2	LDLR	1.79	1.29E-05	27
FABP7	7.43	1.85E-11	3	IL1RAPL1	1.78	1.58E-09	28
LOC645313	4.34	2.25E-10	4	PPP1R3C	1.78	1.64E-07	29
APOE	4.11	1.04E-07	5	ABCD1	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  $\mu$ M, 48 hrs) frente al tratamiento control con DMSO

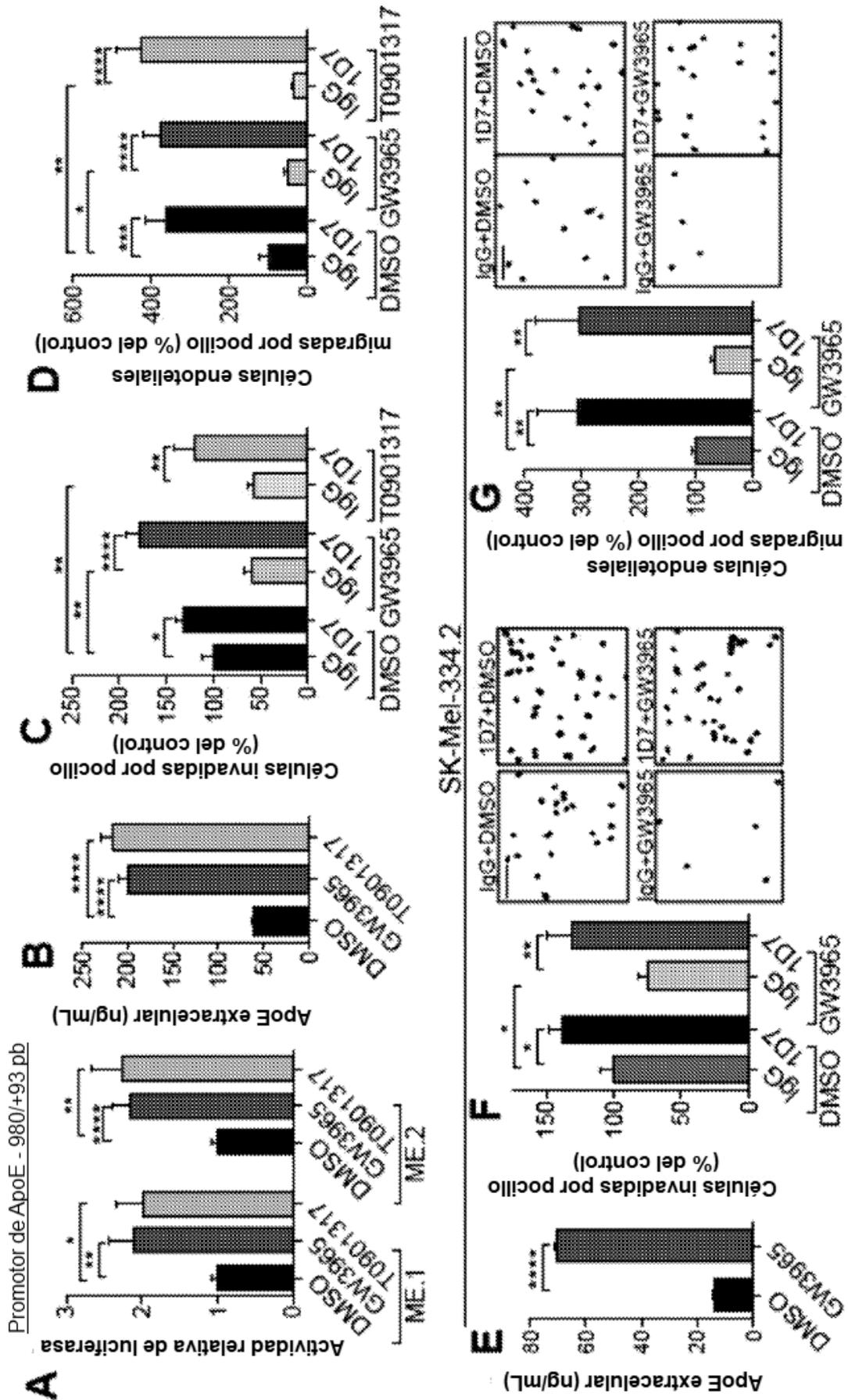
FIGURA 26



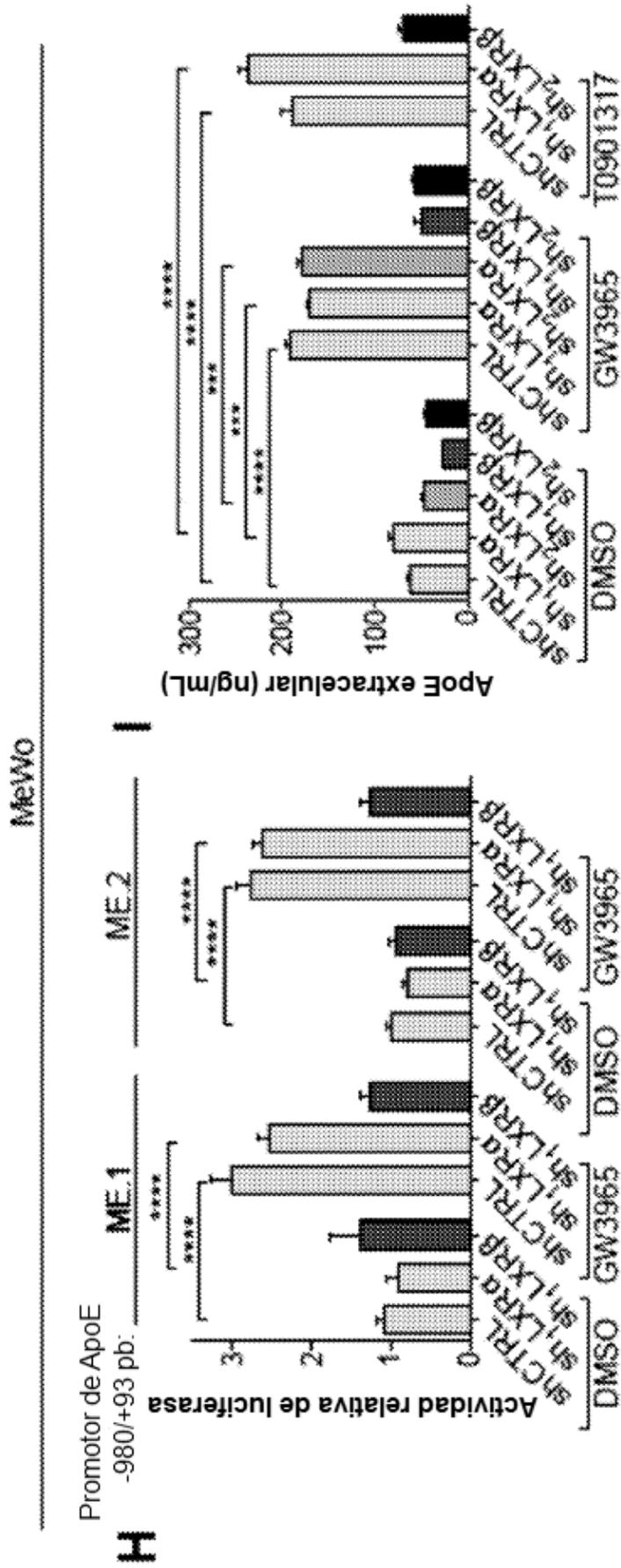
FIGURAS 27A-F



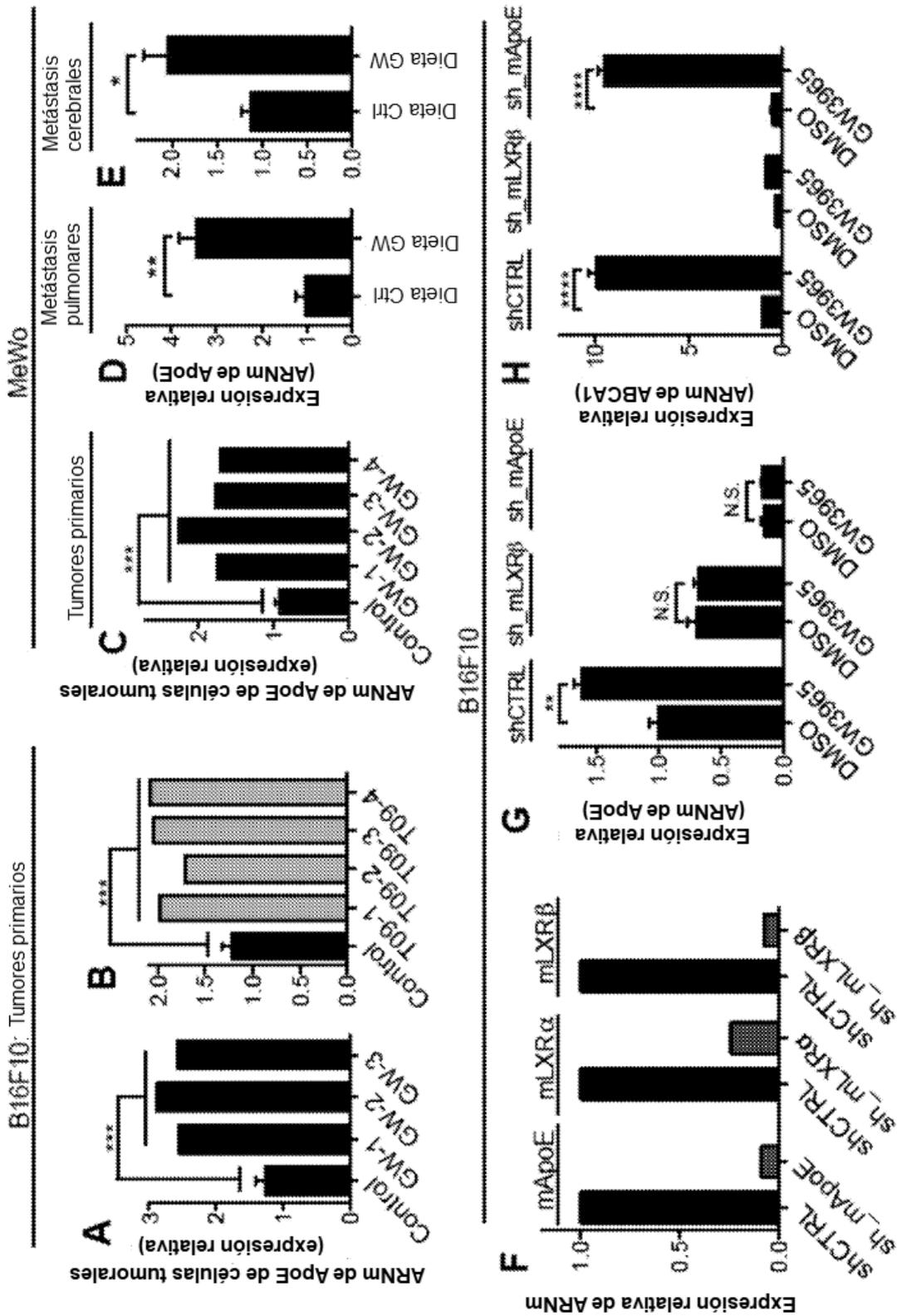
FIGURAS 27G-K



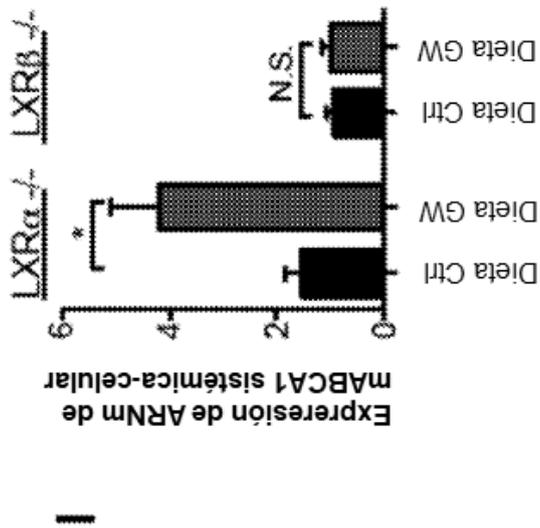
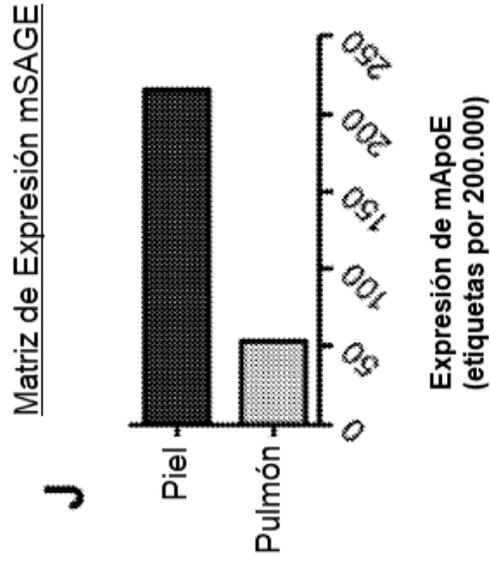
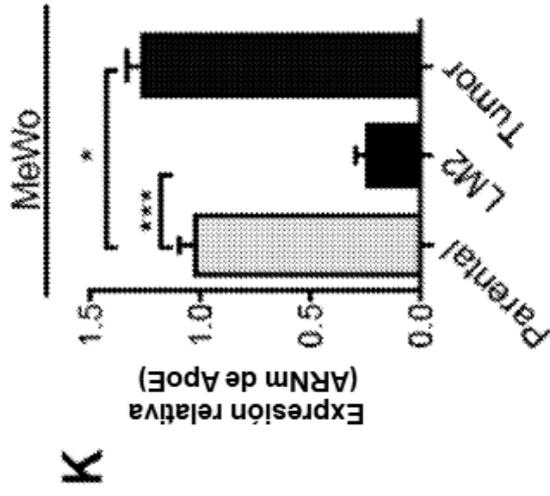
FIGURAS 28A-G



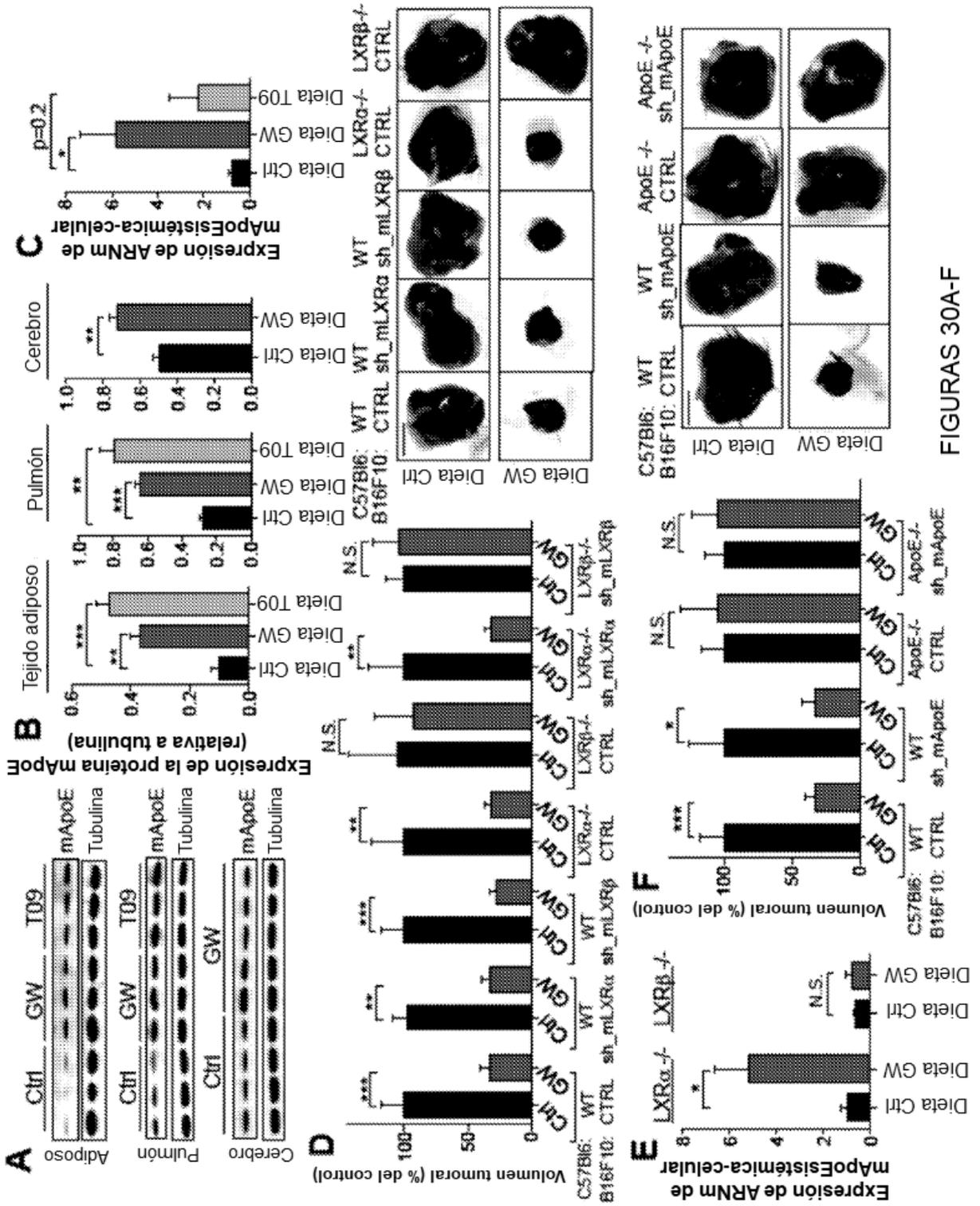
FIGURAS 28H-I



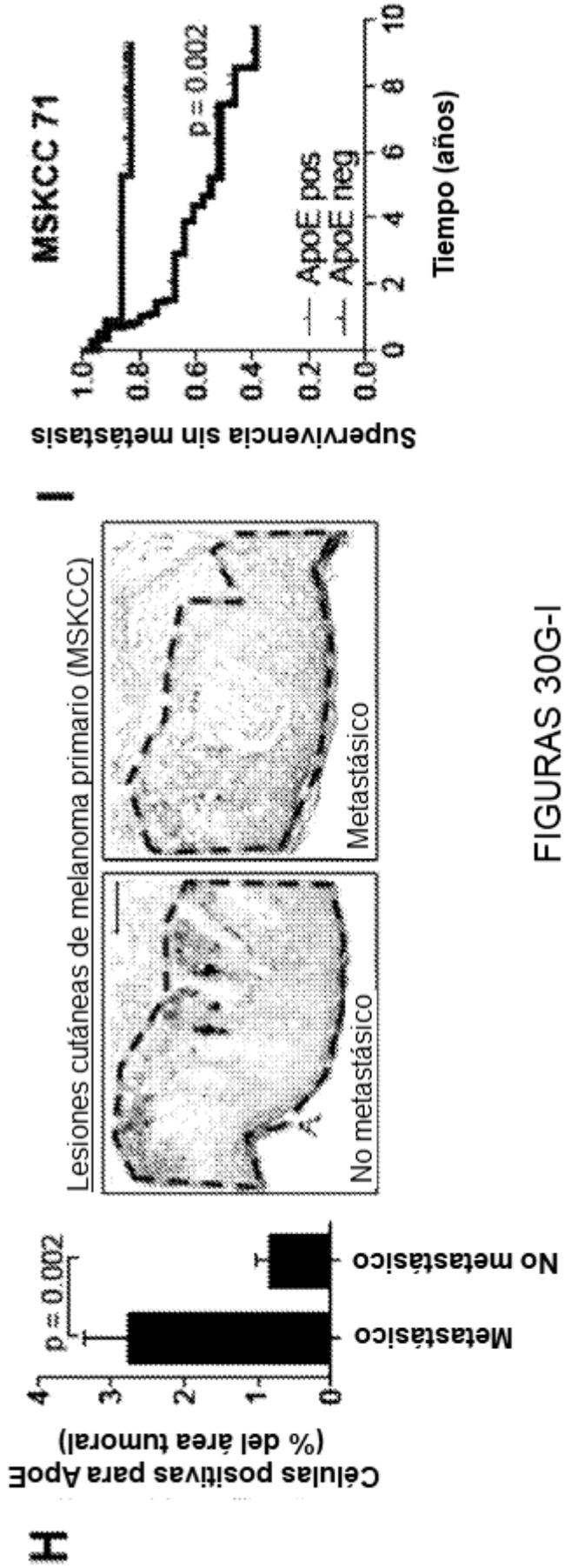
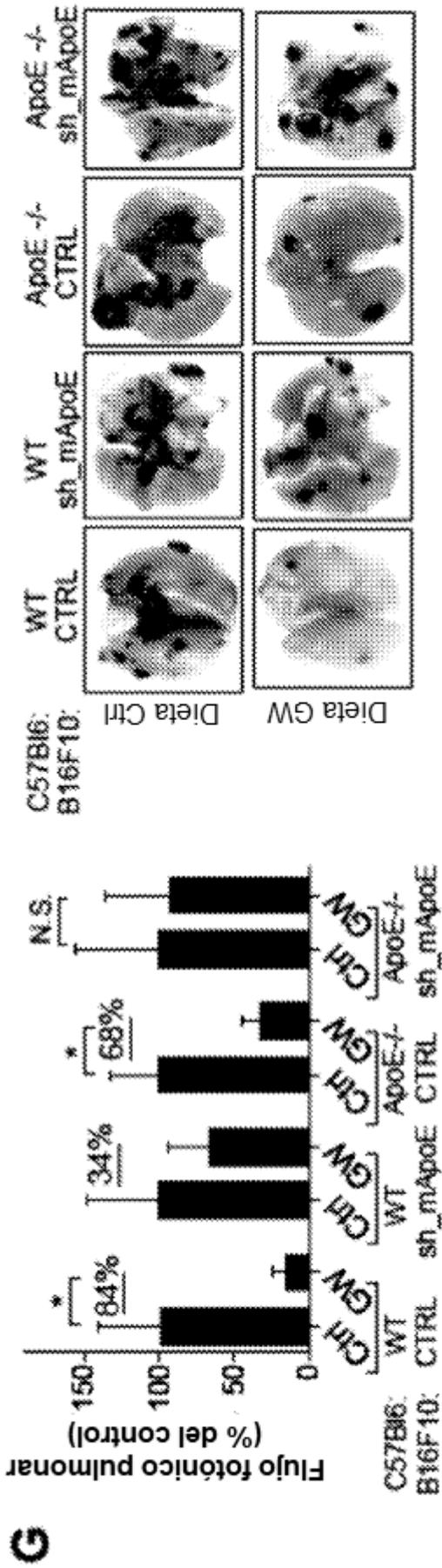
FIGURAS 29A-H



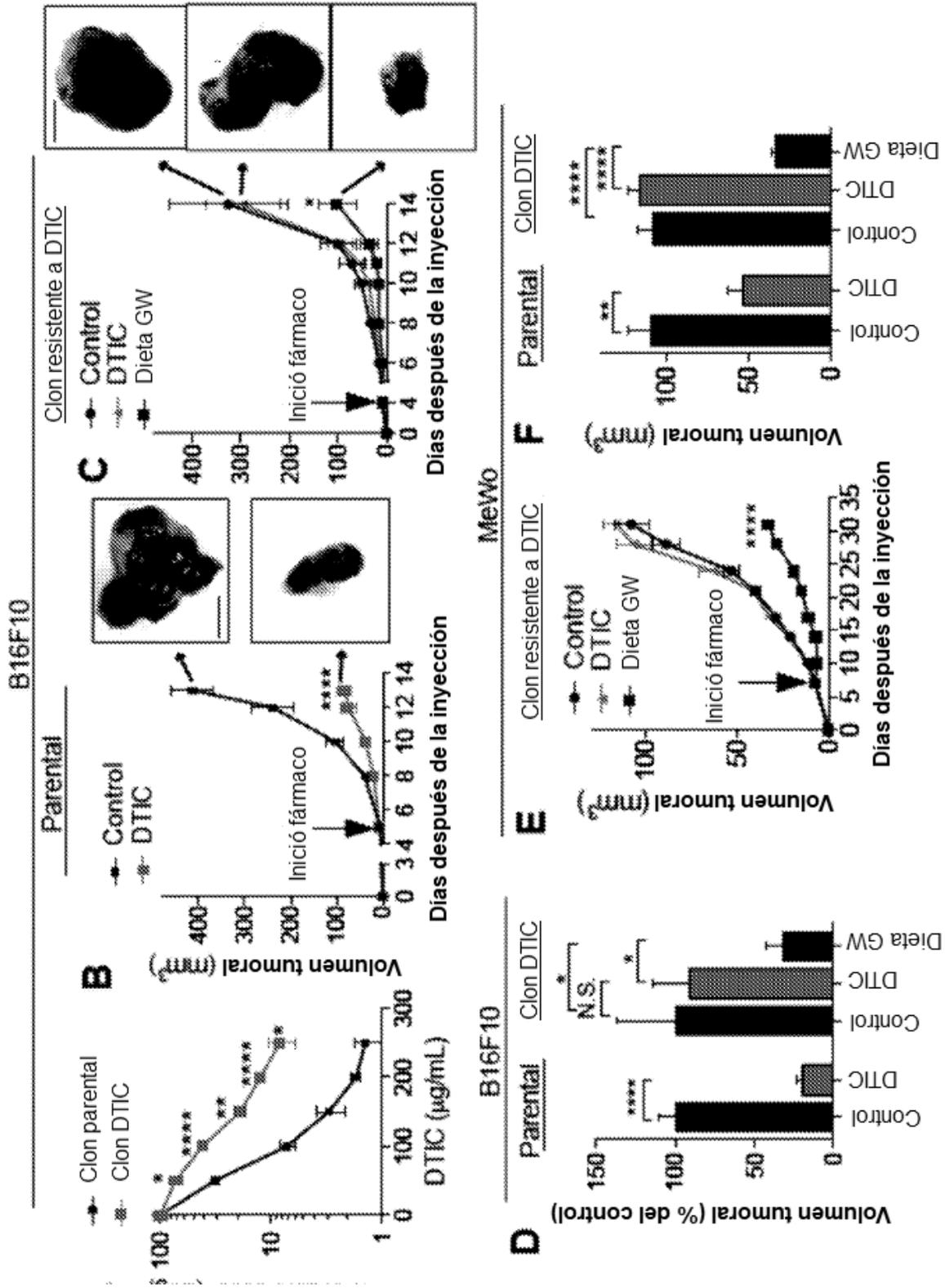
FIGURAS 29I-K



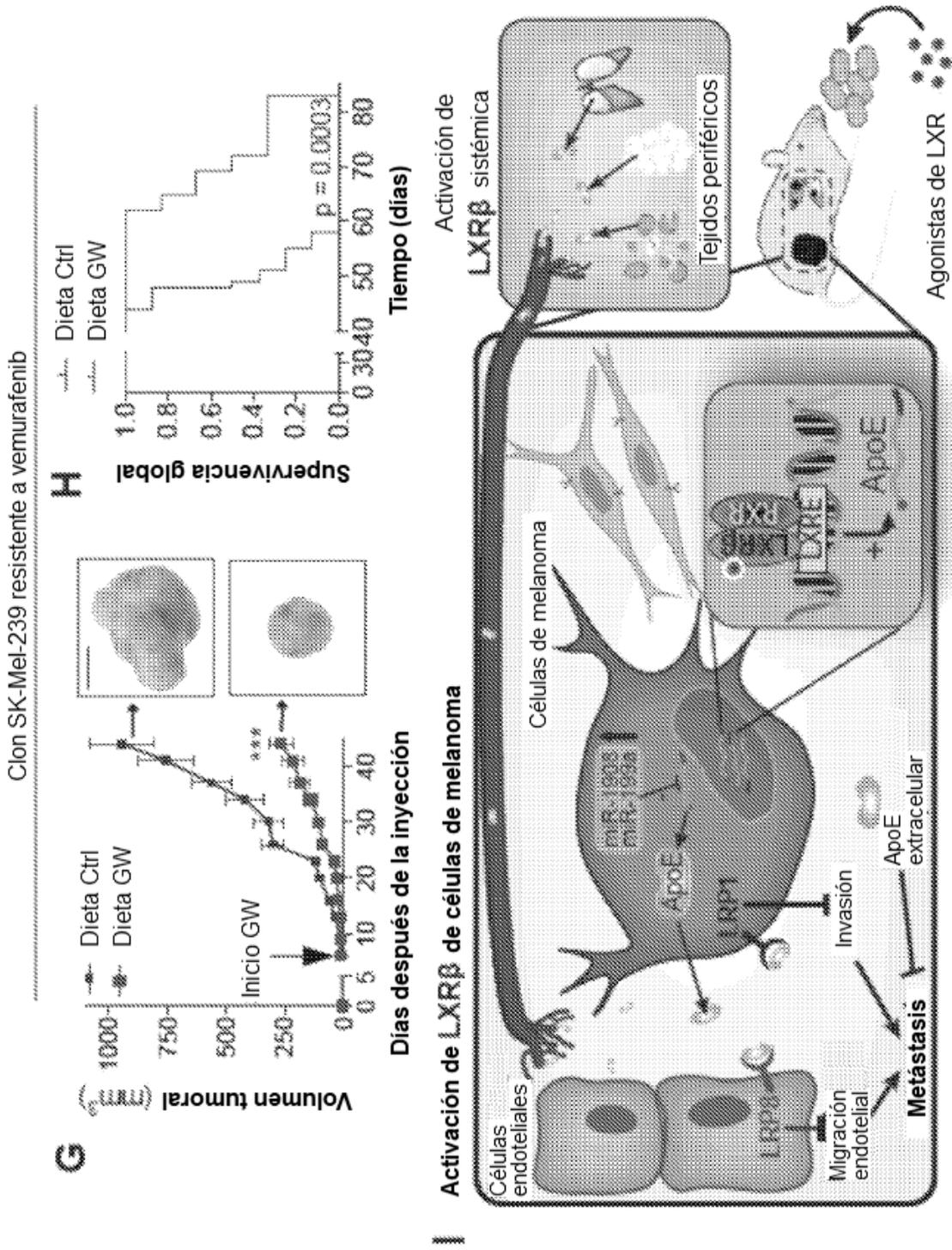
FIGURAS 30A-F



FIGURAS 30G-I



FIGURAS 31A-F



FIGURAS 31G-I

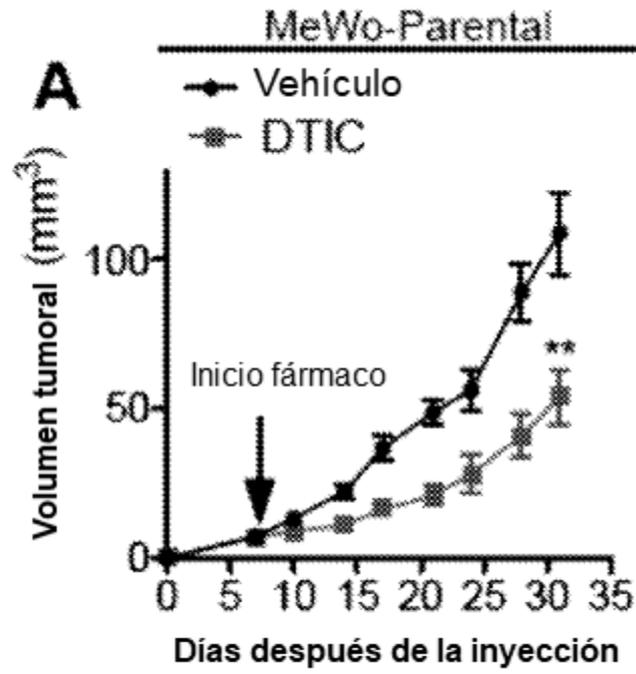
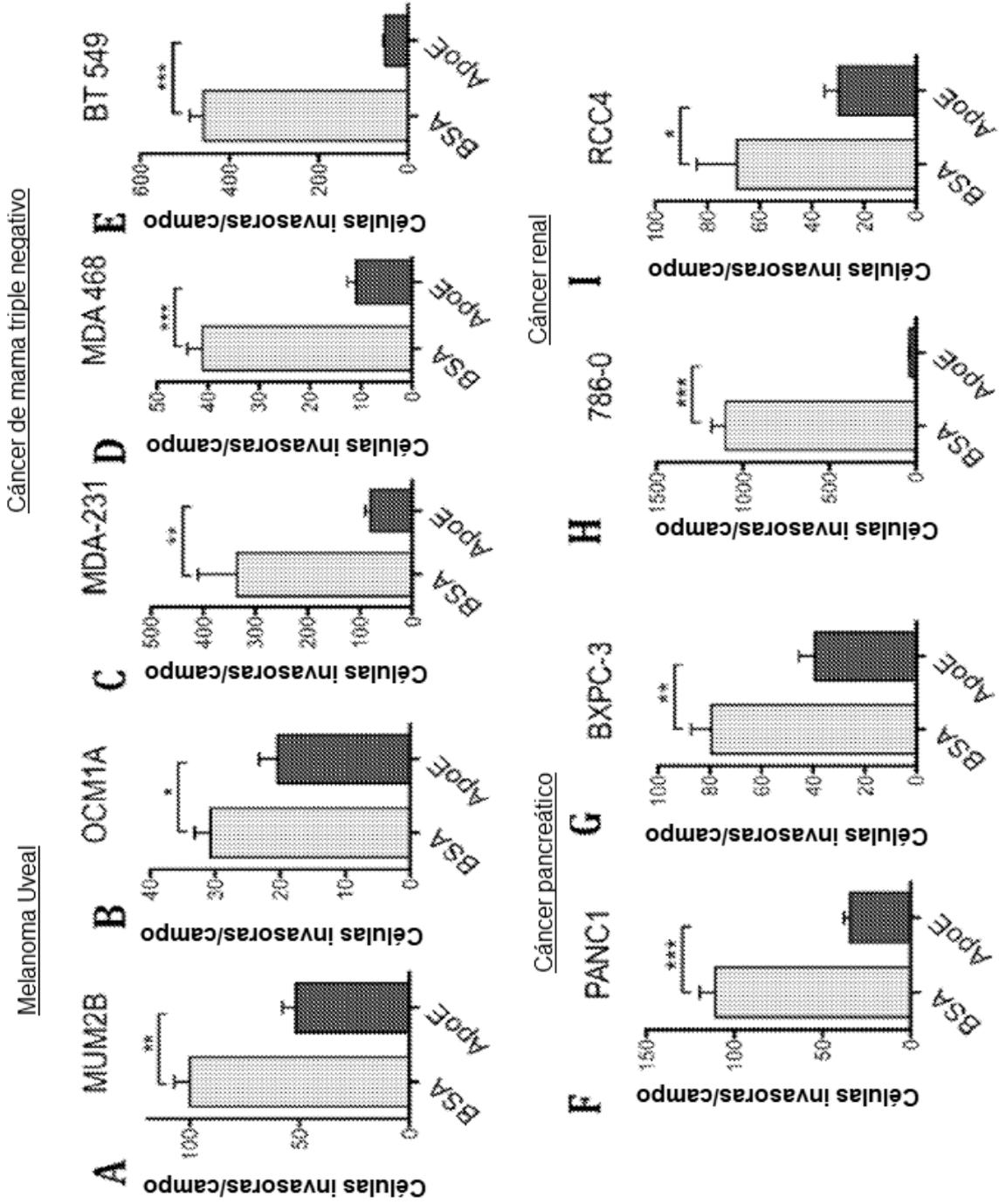
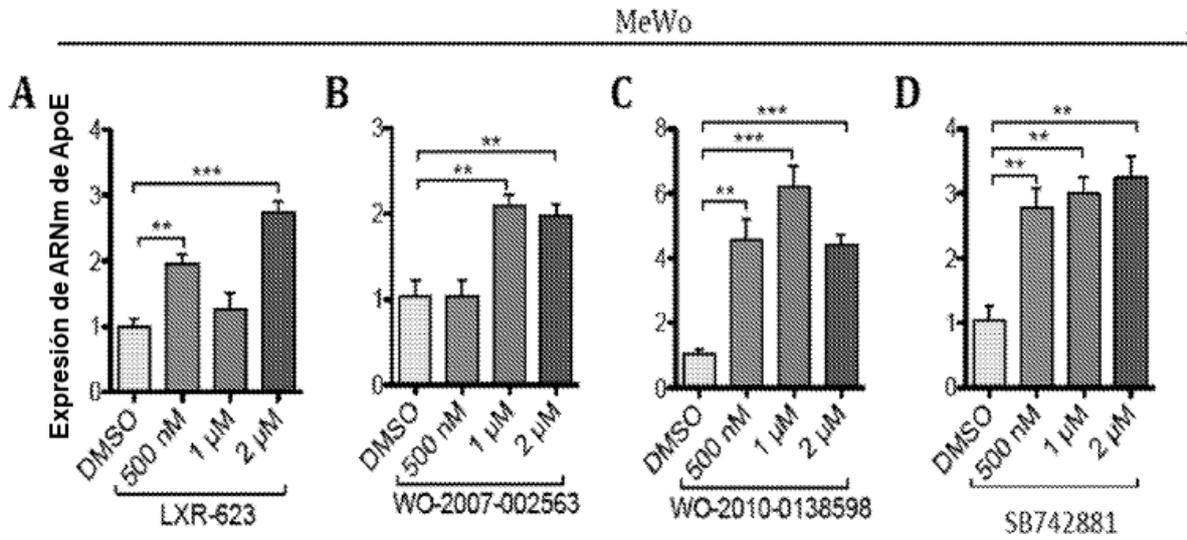


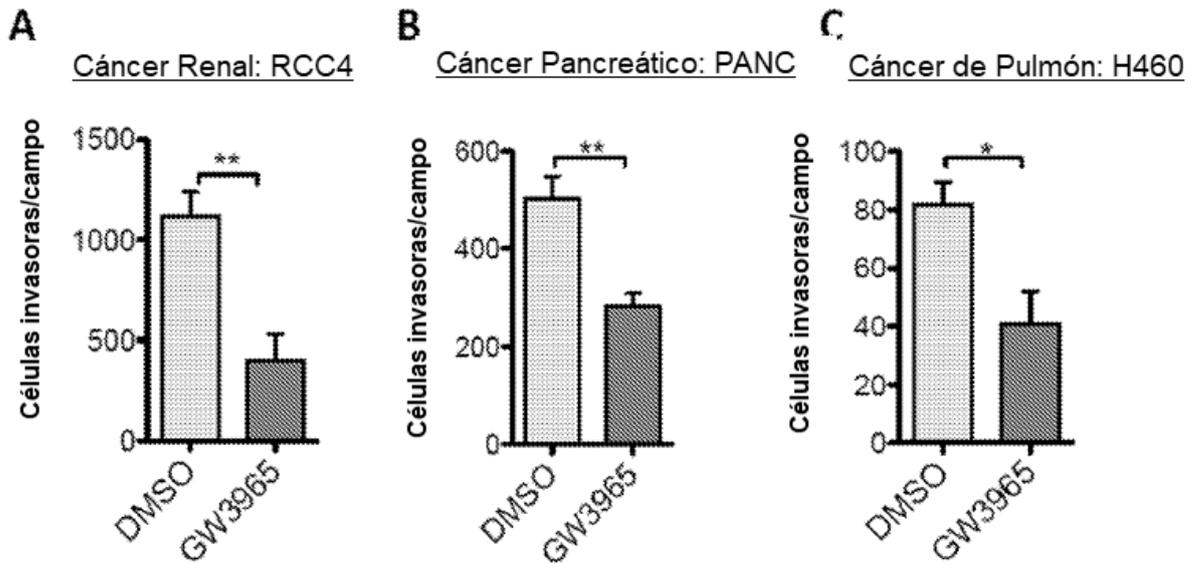
FIGURA 32



FIGURAS 33A-I



FIGURAS 34A-D



FIGURAS 35A-C

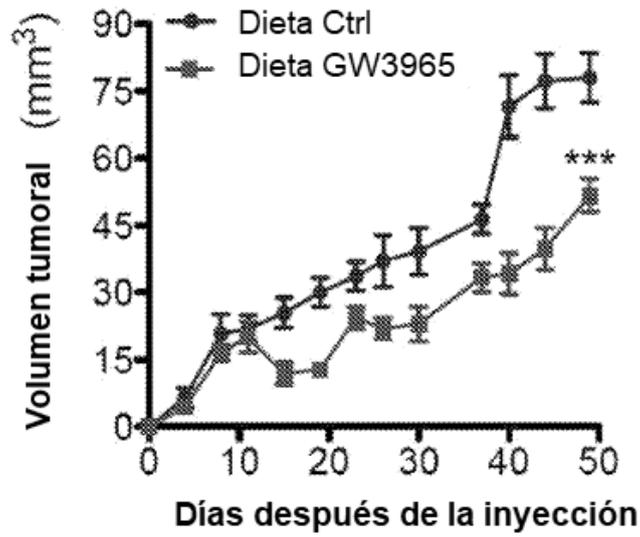
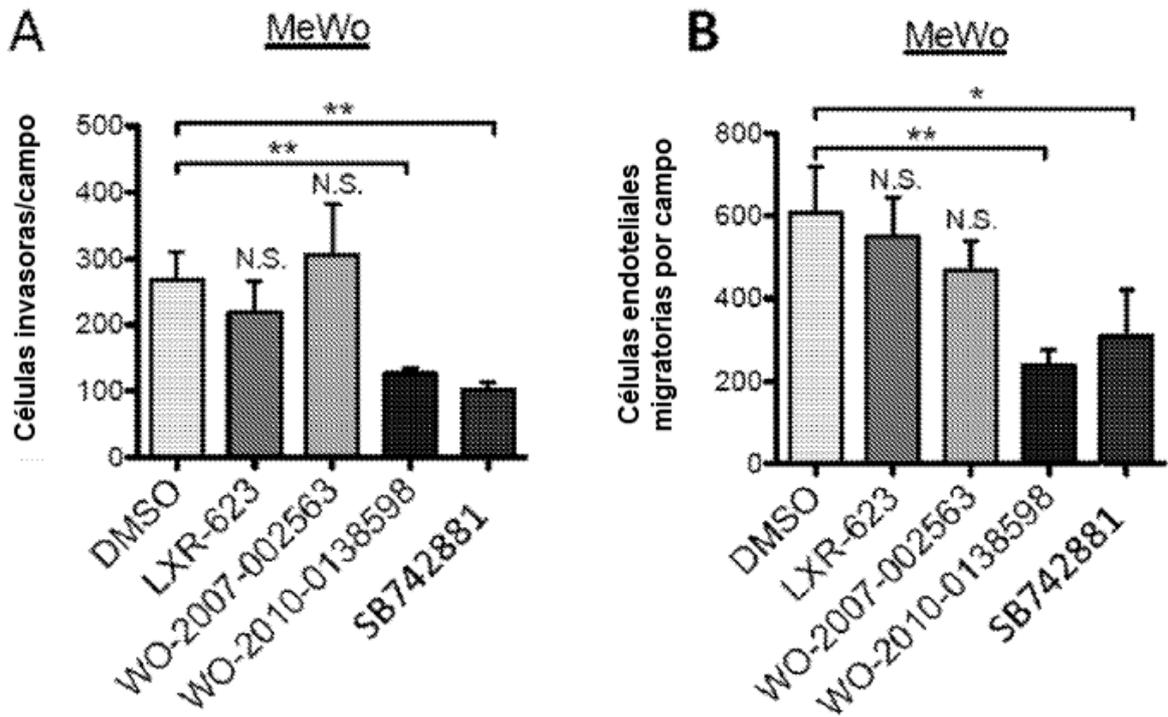
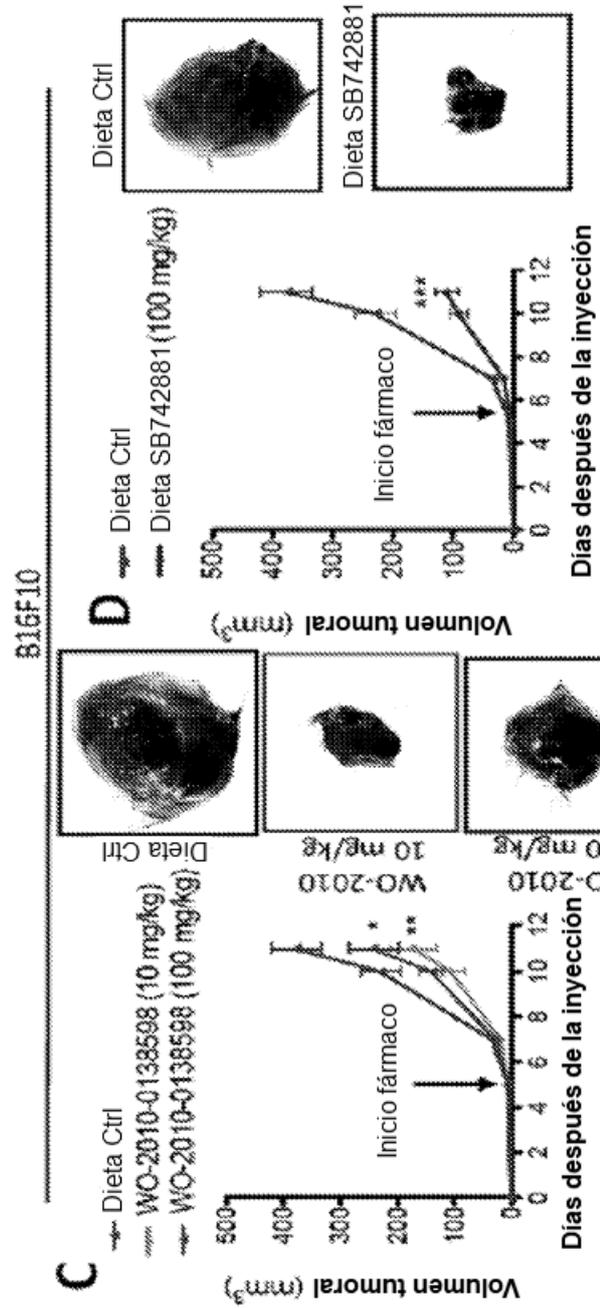
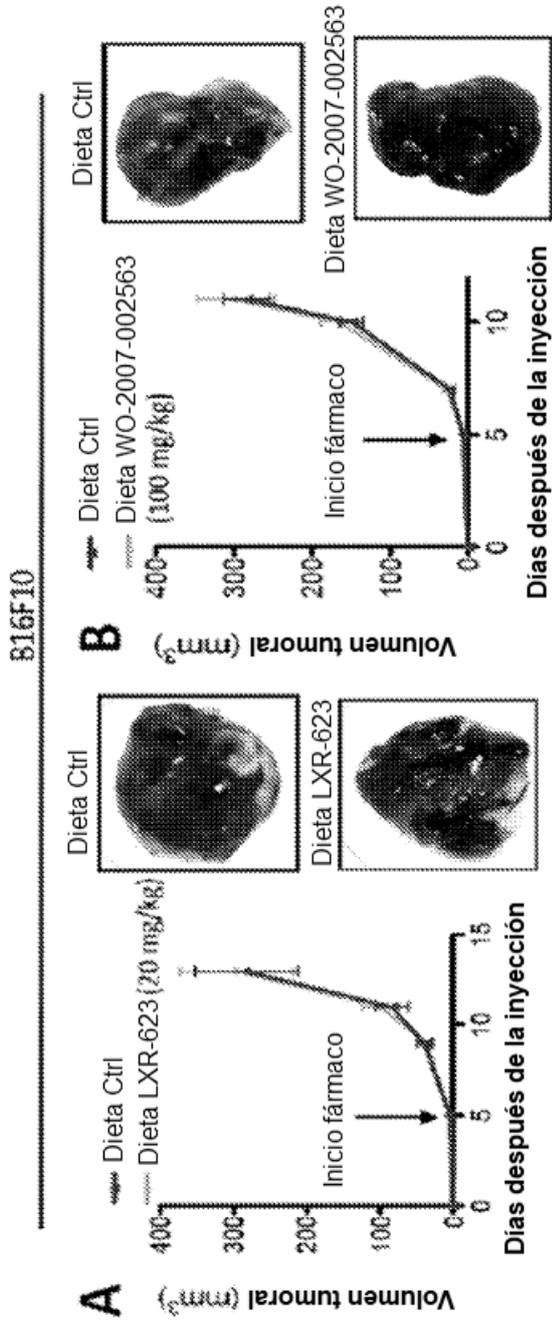


FIGURA 36



FIGURAS 37A-B



FIGURAS 36A-D