

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 β , 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 β es selectivo para LXR β sobre LXR α . En otras realizaciones, el agonista de LXR β tiene actividad para LXR β que es al menos 2,5 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR α . En algunas realizaciones, el agonista de LXR β tiene actividad para LXR β que es al menos 10 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR α . En realizaciones adicionales, el agonista de LXR β tiene actividad para LXR β que es al menos 100 veces mayor que la actividad de dicho agonista para LXR α . En determinadas realizaciones, el agonista de LXR tiene actividad para LXR β que está al menos en 2,5 veces la actividad de dicho agonista para LXR α .
- 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 aromatasa, 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-CSI, inhibidores de FGFR3, inhibidores de VEGF, inhibidores de MEK, inhibidores de ciclina D1, inhibidores de NF-κB, antraciclinas, histona desacetilasas, inhibidores de quinesina, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de COX2, inhibidores de mTOR, antagonistas de calcineurina, IMiD, u otros agentes usados para tratar enfermedades
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
35 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
40 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
50 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
55 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.

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 hematógena a través de la invasión de células sanguíneas; o a través de la invasión del tejido circundante. Los cánceres migratorios incluyen tumores metastásicos y cánceres con migración celular, tales como cáncer de ovario, mesotelioma, y cáncer de pulmón primario, cada uno de los cuales se caracteriza por la migración celular.

Tal y como se usa en la presente memoria, "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 hematógena, por ejemplo, creando tumores secundarios en el sujeto. Dicho comportamiento metastásico puede ser indicativo de tumores malignos. En algunos casos, el comportamiento metastásico puede estar asociado con un incremento en la migración celular y/o comportamiento invasivo de las células tumorales.
- Tal y como se usa en la presente memoria, "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 hematógena.
- 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 imagen bioluminiscente de la colonización metastásica de pulmón después de la inyección intravenosa de 4×10^4 células MeWo parentales que sobreexpresan los precursores para miR-199a, miR-1908, miR-214, o una horquilla control. Los pulmones se extrajeron 63 días después de la inyección y se tiñeron con H y E. n=5. (D) Representación de la imagen bioluminiscente y pulmones teñidos con H y E correspondientes a metástasis pulmonares después de la inyección intravenosa de 4×10^4 células LM2 que expresan una horquilla corta (miR-Zip) que inhibe miR-1908 (m1908 KD), miR-199a-3p (m199a3p KD), miR-199a-5p (m199a5p KD), o una secuencia control (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 2×10^5 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 imagen bioluminiscente. n=5-8 (F) Los niveles de expresión de miR-199a-3p, miR-199a-5p, y miR-1908 se determinaron de una manera ciega por qRT-PCR en una cohorte de lesiones cutáneas de melanoma primario no metastásicas (n=38) y metastásicas (n=33) de pacientes del MSKCC. n=71. Todos los datos se representan como media \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 1×10^6 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en ratones inmunodeficientes, y se monitorizó el volumen tumoral primario con el tiempo. n=4-6. (B) Se dejó que 1×10^5 células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control invadieran a través de un inserto recubierto con matrigel trans-well durante 24 horas, y se cuantificó el número de células invasoras en el lado basal de cada inserto. n=7. (C-D) Se sometieron 1×10^5 células MeWo-LM2 (C) y A375-LM3 (D) altamente metastásicas con inhibición inducida por miR-Zip de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control al ensayo de invasión celular. n=6-8. (E) Se sembraron 5×10^4 células MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control en el fondo de un pocillo, y se dejó que 1×10^5 células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) migraran hacia las células cancerosas durante 16 horas a través de un inserto trans-well. Se midió la capacidad de reclutamiento endotelial cuantificando el número de HUVEC que migraron al lado basal de cada inserto. n=7. (F-G) Reclutamiento endotelial por 5×10^4 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 2×10^5 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 μ 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 1×10^5 células MeWo-LM2 que expresan un vector control o que sobreexpresan ApoE o DNAJA4. n=4. (G) Capacidad de reclutamiento endotelial por 5×10^4 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 μ 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 imagen bioluminiscente y tinción con H y E de pulmones representativos de metástasis pulmonar después de la inyección intravenosa de 1×10^5 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 (APOEsh¹); n=38 (APOEsh²); n=200 (DNAJA4sh¹); n=19 (DNAJA4sh²). Todos los datos se representan como media \pm SEM. Barra de escala, 100 μ 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 μ g/mL) o IgG (40 μ 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 μ g/mL) o un anticuerpo IgG control (40 μ 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 μ M) o ApoE3 recombinante (100 μ 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 μ 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 μ M) o ApoE3 recombinante (100 μ 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 μ g/mL. Después de 24 horas, se inyectaron intravenosamente 4×10^4 células en ratones NOD-SCID, y se monitorizó la colonización pulmonar por imagen bioluminiscente. n=6. (M) Metástasis pulmonares por 5×10^4 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 μ 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 1×10^5 células LM2 transducidas con ARNsi dirigidos a LDLR, VLDLR, LRP8, LRP1, o una secuencia control en presencia bien de BSA (100 μ M) o ApoE3 recombinante (100 μ M). n=4-7. (B) Se transfectaron 1×10^5 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) Imagen bioluminiscente de colonización pulmonar por 1×10^5 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 1×10^5 células endoteliales preincubadas con BSA (100 μ M) o ApoE3 recombinante (100 μ M) durante 24 horas para determinar el fenotipo de reclutamiento endotelial por 5×10^5 células LM2. n=3-4. (E) Se transdujeron 1×10^5 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 1×10^5 células endoteliales en presencia de anticuerpos IgG (40 μ g/mL) o 1D7 (40 μ g/mL) añadidos al medio celular. n=6-8. (G) Migración trans-well por 1×10^5 células endoteliales transducidas con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control en presencia de BSA (100 μ M) o ApoE3 recombinante (100 μ M). n=6-7. (H) Se transdujeron 1×10^5 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 μ g/mL), VEGF (400 ng/mL) + BSA (10 μ g/mL), o VEGF (400 ng/mL) + ApoE3 recombinante (10 μ g/mL). n=3-6. (J) Densidad de los vasos sanguíneos en nódulos metastásicos pulmonares formados después de la inyección intravenosa de 5×10^4 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 μ 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 1×10^5 células en ratones inmunodeficientes. n=5-6. (F) Metástasis sistémicas por 1×10^5 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 4×10^4 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 imagenaría bioluminiscente, y se muestran los pulmones teñidos con H y E representativos extraídos en el día 56. n=5-6. (K) Modelo de regulación dependiente de miARN de invasión metastásica, reclutamiento endotelial, y colonización en melanoma a través del direccionamiento de la señalización del receptor LRP1 de células de melanoma y LRP8 de células endoteliales mediada por ApoE.

Figura 8. La toma como diana de la señalización de ApoE/LRP1 dependiente de miARN promueve la invasión de células cancerosas y el reclutamiento endotelial a través de la inducción de CTGF. (A) Un mapa de calor de los niveles de expresión de CTGF normalizado por varianza, determinado por análisis por qRT-PCR, en (1) células MeWo parentales y células MeWo-LM2, (2) células MeWo parentales que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, o una horquilla control, y (3) células MeWo parentales transducidas con horquillas cortas dirigidas a ApoE o una secuencia control. El mapa de color indica el cambio de las desviaciones estándar de la media. (B) Niveles de CTGF en medio condicionado de células MeWo parentales con inactivación de ApoE determinados por ELISA. n=6; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. (C) Niveles de CTGF, cuantificados por ELISA, en medio condicionado de células MeWo-LM2 altamente metastásicas tratadas con ApoE recombinante en el entorno de inactivación de LRP1 o un control de inactivación. n=3-4; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. (D-E) Las células MeWo parentales con inactivación de ApoE inducida por ARNsh se (1) transfectaron con ARNsi independientes dirigidos a CTGF o una secuencia control o (2) incubaron en presencia de un anticuerpo neutralizante de CTGF (20 µg/mL) o un anticuerpo IgG control (20 µg/mL), y las células se sometieron a ensayos de invasión celular (D) y reclutamiento endotelial (E). n=6-8; valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía; la barra de escala indica 100 µm. Todos los datos se representan como media + SEM.

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

Figura 10. El tratamiento con el agonista de LXR GW3965 eleva los niveles de ApoE de las células de melanoma y suprime la invasión de células cancerosas, el reclutamiento endotelial, y la colonización metastásica. (A-B) Se incubaron células MeWo parentales en presencia de DMSO o GW3965 a las concentraciones indicadas. Después de 48 horas, se extrajo el ARN total, y se determinaron los niveles de ApoE (A) y DNAJA4 (B) por qRT-PCR. n=3. (C) Invasión celular por 1×10^5 células MeWo parentales pretratadas con GW3965 o DMSO durante 48 horas. n=6-7. valores p basados en un ensayo de la t de student de una vía. Todos los datos se representan como media ± SEM. (D) Reclutamiento endotelial por 5×10^4 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 4×10^4 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

imagería bioluminiscente. $n=5-6$; valores p obtenidos usando un ensayo de la t de Mann-Whitney de una vía. Todos los datos se representan como media \pm SEM.

Figura 11. Identificación de miR-7 como un supresor endógeno de metástasis de melanoma. (A) Gráfico de imagería bioluminiscente de colonización metastásica pulmonar después de la inyección intravenosa de 4×10^4 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 4×10^4 células LM2 que sobreexpresan el precursor para miR-7 o una horquilla control. La colonización pulmonar se monitorizó semanalmente por imagería bioluminiscente, 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) Imagería bioluminiscente de metástasis pulmonares e imágenes representativas de pulmones teñidos con H y E correspondientes a derivados metastásicos MeWo-LM2 (A) y A375-LM3 (B) y sus líneas celulares parentales representativas. Se inyectaron intravenosamente 4×10^4 células MeWo-Par/MeWo-LM2 y 1×10^5 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 1×10^5 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 1×10^5 células endoteliales en una placa de 6 pocillos y se dejó que formaran una monocapa. Se sembraron 2×10^5 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 imagería, y se cuantificó el número de células cancerosas que se adhirieron a las células endoteliales. $n=3$. (D) Se sembraron 1×10^6 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 5×10^5 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 5×10^4 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 μ 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 1×10^5 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 4×10^4 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 μ 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 μ M) o APOE (100 μ 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 μ M) o APOE (100 μ 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 μ g/mL) o neutralizante de ApoE 1D7 (40 μ 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 1×10^5 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 1×10^5 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 1×10^5 células endoteliales con ARNsi dirigidos a LRP8 o una secuencia control y se dejó que migraran en trans-well hacia 5×10^4 células MeWo-LM2 que expresan una horquilla corta control (D; $n=8$) o 5×10^4 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 μ 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 5×10^5 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 β 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 1×10^5 MeWo, 5×10^4 HT-144, 5×10^5 SK-Mel-2, y 5×10^4 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 5×10^4 MeWo, HT-144, SK-Mel-2, y SK-Mel-334.2 para determinar su capacidad de reclutar 1×10^5 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 1×10^5 MeWo (D) y 1×10^5 HT-144 (E) que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigidos a *LXR α* o *LXR β* 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 5×10^4 MeWo (F) y 5×10^4 HT-144 (G), transducidas con ARNsh lentivirales dirigidos a *LXR α* o *LXR β* 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 1×10^5 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 α* y *LXR β* , 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 α* o *LXR β* . 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 5×10^4 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 mg/kg/día o 100 mg/kg/día) (A) o T0901317 (20 mg/kg/día) (B). Las imágenes tumorales representativas mostradas corresponden a tumores extraídos en el día final (d12). $n=10-18$ (A), $8-10$ (B). (C-E) Crecimiento tumoral primario por las células de melanoma humano 1×10^6 MeWo (C), $7,5 \times 10^5$ SK-Mel-334.2 (D), y 2×10^6 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 mg/kg o 100 mg/kg , según se indica). Las imágenes tumorales mostradas corresponden al último día de mediciones. $n=6-34$ (C), 8 (D), 5 (E). (F) Se inyectaron subcutáneamente 5×10^4 células B16F10 en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta 150 mm^3 , los ratones se alimentaron continuamente con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (150 mg/kg), y el crecimiento tumoral se midió diariamente. $n=6-13$. (G-I) Supervivencia global de los ratones después del injerto subcutáneo de las células 5×10^4 B16F10 (G), 1×10^6 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 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 1×10^6 células de melanoma humano MeWo en respuesta al tratamiento de los ratones con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg) durante 35 días. $n=5$. El volumen tumoral se calculó como $(\text{diámetro pequeño})^2 \times (\text{diámetro grande})/2$. Todos los datos se representan como media \pm SEM. Barra de escalas, 5 mm (A-D), $50 \mu\text{m}$ (J, K), $25 \mu\text{m}$ (L).

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

Figura 23. El agonismo de LXR suprime las metástasis de melanoma al pulmón y cerebro. (A) Se pretrataron células MeWo con DMSO o GW3965 ($1 \mu\text{M}$) durante 48 horas y se inyectaron intravenosamente 4×10^4 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 4×10^4 células MeWo inyectadas intravenosamente en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (20 mg/kg) o T0901317 (20 mg/kg) empezando 10 días antes de la inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de imagenología $n=5-6$. (B-C) Imagenología bioluminiscente de metástasis pulmonares por 4×10^4 células MeWo inyectadas intravenosamente en ratones NOD Scid que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (20 mg/kg) o T0901317 (20 mg/kg) empezando 10 días antes de la

inyección de las células cancerosas. Los pulmones teñidos con H y E representativos corresponden al día final de imaginería n=5-6. (F) Flujo fotónico sistémico y cerebral después de la inyección intracardiaca de 1×10^5 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 1×10^6 células de melanoma MeWo. También se muestran los pulmones representativos teñidos para vimentina humana. n=7-9. (I) Se inyectaron intravenosamente 4×10^4 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 4×10^4 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; Braf^{V600E/+}; Pten^{lox/+}* después de la inducción de melanoma general por la administración intraperitoneal de 4-HT (25 mg/kg) en tres días consecutivos. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). n=10-11. (B) Carga de tumor de melanoma, expresada como el porcentaje de área de la piel dorsal, medida en el día 35 en ratones *Tyr::CreER; Braf^{V600E/+}; Pten^{lox/lox}* a los que se administró un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg) después de la inducción del melanoma como se describe en (A). n=4-5. (C) Número de nódulos metastásicos macroscópicos en los nódulos linfáticos de la glándula salivar detectados post-mortem en ratones *Tyr::CreER; Braf^{V600E/+}; Pten^{lox/lox}* que se alimentaron con un pienso control o un pienso que contenía GW3965 (100 mg/kg) después de la inducción global de la progresión del melanoma como se describe en (A). n=7-8. (D) Crecimiento tumoral después de la inyección subcutánea de 1×10^5 células de melanoma primario *Braf^{V600E/+}; Pten^{-/-}; CDKN2A^{-/-}* en ratones C57BL/6-WT singénicos. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3 , los ratones se alimentaron con un pienso control o un pienso suplementado con GW3965 (100 mg/kg). n=16-18. (E) Supervivencia global de ratones C57BL/6-WT a los que se inyectaron subcutáneamente 1×10^5 células de melanoma *Braf^{V600E/+}; Pten^{-/-}; CDKN2A^{-/-}* y se trataron con una dieta con GW3965 (100 mg/kg) o una dieta control después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm^3 . n=7-8. (F) Colonización pulmonar por 1×10^5 células de melanoma primario *Braf^{V600E/+}; Pten^{-/-}; CDKN2A^{-/-}* 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; Braf^{V600E/+}; Pten^{lox/lox}* después de la inducción de melanoma general por administración intraperitoneal de 4-HT (25 mg/kg) en tres días consecutivos. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron aleatoriamente a una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). n=7. (B) Imágenes representativas de ratones C57BL/6 *Tyr::CreER; Braf^{V600E/+}; Pten^{lox/lox}* alimentados con una dieta control o dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg) tomada 43 días después de la inducción del melanoma por administración intraperitoneal de 4-HT.

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

Figura 27. La activación de LXR β induce la expresión de *ApoE* en células de melanoma; ApoE media la supresión dependiente de LXR β 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 5×10^4 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 $40 \mu\text{g/mL}$ a cada trans-well al inicio del ensayo. n=4. (G-H) Invasión celular (G) y reclutamiento endotelial (F) por 1×10^5 y 5×10^4 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 α* o *LXR β* 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 α* o *LXR β* y tratadas con

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

Figura 28. La activación de LXR β 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 μ 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 μ M durante 72 horas. n=3-4. (C) Invasión celular por 1×10^5 células MeWo pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μ M durante 72 horas. Al inicio del ensayo, se añadió un anticuerpo neutralizante de ApoE (1D7) o un anticuerpo IgG control a 40 μ g/mL a cada trans-well, como se indica. n=7-8. (D) Se ensayaron 5×10^4 células MeWo, pretratadas con DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μ M durante 72 horas, para determinar su capacidad de reclutar 1×10^5 células endoteliales en presencia de los anticuerpos 1D7 o IgG a 40 μ 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 μ M durante 72 horas. n=4. (F-G) Se sometieron 5×10^4 células SK-Mel-334.2, pretratadas con GW3965 a 1 μ M durante 72 horas, a los ensayos de invasión celular (F) y reclutamiento endotelial (G) en presencia de anticuerpos 1D7 o IgG a 40 μ 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 α o LXR β en presencia de DMSO o GW3965 (1 μ 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 α o LXR β en respuesta al tratamiento con GW3965 o T0901317 (1 μ M) durante 72 horas. n=3-8. Todos los datos se representan como media \pm SEM. Barra de escala, 50 μ 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 mm³, 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 α , LXR β , 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 α (sh_mLXR α), LXR β de ratón (sh_mLXR β), 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 β de ratón o *ApoE* de ratón. Las células se trataron con DMSO o GW3965 a 5 μ 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 α -/- o LXR β -/- 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 β 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 α de ratón (sh_mLXR α) o LXR β de ratón (sh_mLXR β) en ratones C57BL/6-WT, LXR α -/- o LXR β -/-. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm³, 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 α -/- o LXR β -/- 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 5×10^4 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 mm³, 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 5×10^4 células B16F10

transducidas con un ARNsh control o sh_mApoE e inyectadas intravenosamente en ratones C57BL/6-WT o ApoE^{-/-}. Empezando a los 10 días antes de la inyección de las células cancerosas, los ratones se asignaron a un tratamiento con una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (20 mg/kg). Se cuantificaron las metástasis pulmonares en d22 por 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 \pm SEM. Barra de escala, 5 mm (D y F), 100 μ m (H).

Figura 31. La activación de LXR β suprime el crecimiento *in vivo* de líneas de melanoma resistentes a dacarbazina y vemurafenib. (A) Crecimiento celular *in vitro* por $2,5 \times 10^4$ células parentales B16F10 y células B16F10 resistentes a DTIC derivadas *in vitro* en respuesta a varias dosis de dacarbazina (DTIC) añadida al medio celular durante 4 días. n=3. (B-D) Crecimiento tumoral por 5×10^4 células parentales B16F10 sensibles a DTIC (B) o 5×10^4 células B16F10 resistentes a DTIC (C) inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6-WT. Después del crecimiento tumoral hasta un volumen de 5-10 mm³, 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 5×10^5 células en ratones NOD Scid gamma. Después de la formación de tumores con un volumen de 5-10 mm³, 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 2×10^6 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 mm³. n=7-8. (H) Supervivencia global de los ratones después del injerto de 2×10^6 células SK-Mel-239 resistentes a vemurafenib. Después del crecimiento de los tumores hasta un volumen de 5-10 mm³, 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 LXR β 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 \pm SEM. Barra de escala, 5 mm.

Figura 32. Supresión inducida por dacarbazina del crecimiento tumoral por células de melanoma humano. (A) Crecimiento tumoral por 5×10^5 células parentales MeWo sensibles a DTIC inyectadas subcutáneamente en ratones Nod SCID gamma. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 5-10 mm³, 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) 5×10^4 células de melanoma uveal humano MUM2B y OCM1, (C-E) 5×10^4 células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-231, MDA-468, y BT 549, (F-G) 5×10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1 y BXPc-3, y (H-I) 5×10^4 células de cáncer renal humano 786-00 y RCC4 para determinar su capacidad de invasión a través de insertos trans-well recubiertos con matrigel *in vitro*. Se añadieron BSA o ApoE recombinante al medio celular a 100 μ g/mL al inicio del ensayo. n=4. Todos los datos se representan como media \pm 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 μ M, o 2 μ M durante 48 horas. Los niveles de expresión de ApoE se cuantificaron posteriormente por qRT-PCR. n=3. Todos los datos se representan como media \pm 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 5×10^4 células de cáncer renal humano RCC (A), 5×10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1 (B), y 5×10^4 células de cáncer de pulmón humano H460 (C) que se trataron con DMSO o GW3965 a 1 μ M durante 72 horas antes del ensayo. n=4. Todos los datos se representan como media \pm 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 2×10^6 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 1×10^5 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 5×10^4 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 5×10^4 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 $5\text{--}10 \text{ mm}^3$, los ratones se asignaron aleatoriamente a un tratamiento con una dieta control, un tratamiento con una dieta suplementada con LXR-623 a 20 mg/kg/día (A) un tratamiento con una dieta suplementada con WO-2007-002563 Ej. 19 a 100 mg/kg/día (B), un tratamiento con una dieta suplementada con WO-2010-0138598 Ej. 19 a 10 mg/kg/día o 100 mg/kg/día (C), o un tratamiento con una dieta suplementada con SB742881 a 100 mg/kg/día (D). n=8-10. Todos los datos se representan como media \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. Rev. Biochem. 79, 351-379; Filipowicz et al, 2008 Nat. Rev. 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)

gggataccttgagtcctactcagccccagcggaggtgaaggacgtccttccccaggagccgactggccaatcacaggcaggaag
atgaagggttctgtgggtgctggtgacattctggcaggatgccaggccaagggtggagcaagcgggtggagacagagcc
ggagcccgagctgcccagcagaccgagtgccagagcggccagcgtgggaactggcactgggtcgttttgggattacctg
cgctgggtgcagacactgtctgagcaggtgcaggaggagctgctcagctcccagggtcaccaggaactgagggcgctgatgg
acgagaccatgaaggagttgaaggcctacaatcggaactggaggaacaactgaccccggtggcgaggagacgcgggcac
ggctgtccaaggagctgcaggcggcgaggccggctgggcgcggacatggaggacgtgtgcggccgctggtgcagtacc
gcggcgaggtgcaggccatgctcgccagagcaccgaggagctgcgggtgcgcctgcctccacctgcgaagctgcgtaa
gcggctcctcccgatgccgatgacctgcagaagcgctggcagtgatgaccaggccggggcccgagggcgccgagcgcg
gcctcagcgccatccgcgagcgcctggggccctggtggaacagggccgcgtgcggggccgactgtgggctccctggccg
gccagccgctacaggagcgggcccaggcctggggcgagcggctgcgcgcggatggaggagatgggcagccggacccg
cgaccgctggacgaggtgaaggagcaggtggcgagggtgcgcgccaagctggaggagcaggcccagcagatacgctgc
aggccgagggcctccaggcccgcctcaagagctggttcagccctggtggaagacatgcagcggcagtgggccgggctggt
ggagaagggtgcaggctgccgtgggcaccagcgcgcccctgtgccagcgacaatcactgaacgccgaagcctgcagccatg
cgacccacgccaccccgctcctcctgcctcgcgcagcctgcagcgggagaccctgtccccgcccagccgctcctctgggg
30 tggaccctagtftaataaagattcaccaagtttcacgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

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

mkvlwaallv tflagcqv kv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelalgr fwdylrwvqt lseqvqeell
ssqvtqlra lmdetmkelk aykseleeql tpvaeetrr lskelqaaqa rlgadmedvc grlvqyrgev
qamlgqstee lrvlashlr klrklrrda ddlqkrlavy qagaregaer glsairerlg plveqgrvra atvgsilagqp
lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrldv keqvaevrak leeqaqqirl qaeafqarlk swfeplvedm
qrqwaglv ek vqaavgtsaa pvpsdnh

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

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

[illegible]

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

marggsqsws sgesdgqpke qtpekprhkm vketqyydil gvkpsaspee ikkayrkla kyhpdknpe
 gekfklisqa yevlsdpkkr dvydqqgeqa ikeggsgsps fsspmdifdm ffggggrmar errgknvvhq
 lsvtledlyn gvtkkalqk nvicekcegv ggkkgsvekc plckgrgmqi hiqqigpgmv qqiqtvci
 kgqgerinpk drcescsgak virekkiiev hvekgmkgdq kilfhgedq epelepgdvi ivldqkdhs
 fqrghdlm kmkiqlseal cgfkktiktl dnrlvitsk agevikhgdl revrdegmpi yakplekil iiqflvifp
 khwlsleklp qleallpprq kvritddmdq velkefcpe qnwrqhrey eededgpqag
 vqcqta

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

gugaccgugacgcgcgagcggcgggcgggggcgcgggccaggggcgcgggccaggugccggcaggggcuccgg
 ggcgucugaccggccucgccccccccccgcagacacaagauggugaaggagaccaguacuaugacauccugggc
 gugaagcccagcgcgucggggaggagaucaagaaggccuauccggaagcuggcgcucaaguaccacccggacaagaac
 ccggaugagggcgagaaguuaaacaucuaucacaggcaugaagugcuuucagauccaaagaaaagggauguua

ugaccaaggcggagagcaggcaauuaaagaaggaggcucaggcagcccagcuucucucacccaugggacauuuug
acauguucuuugggugggugggagcggauaggcuagagagagaaggaggaagauguuacaccaguuuucuguaac
ucuuagaagaucuaauuaauggagucacgaagaaauuggccuccagaaaaauguaauuugugagaaaugugaaggu
guugguggggaagaagggaucggugggagaagugcccgcugugcaagggggcgggggaugcagauccacauccagcaga
ucggggccgggcaugguacagcagauccagaccgugugcaucgagugcaagggccaggguagcgcgaucaccccaag
gaccgcugcgagagcugcagcggggccaaggugauccgugagaagaagauuauucgagguacauuuugaaaaaggua
ugaaaagauagggaauacuaauuucagggagaaggagauccagagccugagcugggagccugguugauucuaau
ugugcuugaucagaaggaucauagugucuucagagacgaggccaugacuugaucaugaaaaugaaaauucagcuu
ucugaagcucuuuugggcuucaagaagacgaauaaacauuggacaaucgaauucuuuuaauuacauccaaagcagg
ugaggugauaaaagcacggggaccugagauccgugcggaugaaaggaaugcccaucuaaaagcaccuccggaaaaag
ggauucugaucauacaguuuuuaguaucuuuccugaaaaacacuggcuuucucuggaaaaagcuuccucagcugga
agcuuuacuccuccucgacagaaaugaggauuacagaugacauggaucaaggugggagcugaaggaguuuuugucc
aaugagcagaacugggcugcagcacaggaggccuacgaggaggacgaagacgggccccaggcugggagugcagugcca
gacggcaugacguggugcgggggcagcugggccccaccggacuagcacauaugaauuaaaguuuggcacaauagaaaa
ugacaucgcuuaauggccuuguguuuugggauguccuguguauguguucagcauucuaauuugcugagugucuuu
uuggcuuuucuuuuggguuguaacuaaaguuuauagcuuaauuuuauuuuaaauuuuuaaaguuuaaauuacaccucua
ucugcauauaggaaucuguucauuuucuaauuucaggaauuacuuuugagauugcagugauuugcaccauacuuugug
cuucuauguggcuuugccauaaucagugucaccauaaggcacagcccaguuagcagcuuagcccccuagcaaaccc
caaggcacaaagugggcauccugacucaucucuaaggucugugguuucucccucuuucccuuggcagaguuauugag
ggcaugaucucaggggcugcuaagauaacaauucugaggauuucuaugaauccucuaaaagaaauaaagcacauccgu
ggauccggacauggcugcaugugccugcuuaacaggggccaacuuaguuccuacuguuucugugcccuucaguggaugg
aacgugagugucugaucaucucucuuuggaaguuuucugaaccuuccaagcucugugggugaggacaaaccaguguuu
gaaucauauugcugauaauugcuuugccugugaccucacaccuuguuucucaggguuuuuaugauuuucugugaca
acuuuugcaauugcuuuccaccaaaugucuuacuuuguaaaagaaaacuaaaucuuucuguguccccggcagccucagu
gcagcaacagaagccaaggagaaugcugcugguuuggcccauggcacagccagcuucucugaccaguaauccgggg
ugacuugaggggucugcaaaaggcauagaacucccaguguuuuccaccucauucucccagauugagcucccuuccaaa
ggauccguuccucuaucagcagccauuuuacaaaggguuuccugcucaagugauguuuugguaagaacuuucgug
aguuccacuguggauuacaguuuuguauggacuacuacuguaaaauuauagcuuuguuuggagggaauuagucuuuau
uuuauuacagacagguagacuacaauucgaacuuaggguuaccucagucuuuagccauuacugcuuauuuucuuuuc
cccaagucacaaaaaacuuuaagcugcuggguuuaaagcagaggccaccugucagauuacccuacccuuuuuuggu
uacauaggcaccugagaguuuacucagaccagggaucuuuccuagggagggucaaaugcagaucaagaccaggu
aaggugaaccagcugcagggaccaggguucccgcaaaacauugccagcuagugaggcauauuugcucaaaaguuaga
aacagcccaccugugccacuugaccuuugugaggauagauauaaaaucacuucuuuccaaggaagccuaggugaa
aaucuaauuuuaaauaggaccacaacucuggggugucguuuuugugcugugacuuccuauuuuugcuuaaagaacua
cuguuuuaguuugguaauugguguaaaauuacauucagcuccuucuuugucuuuuuuuaggaauuuggaggggugucguu
aaaauuuuuauuccaccuguaauuugucacuuuuuuuuuuuuuagcugguuagagagauaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaa

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

mvketqyydi lgvkpsaspe eikkayrkla lkyhpdknpd egekfkliq ayevlsdpkk rdvydqggeg
aiekgsgsp sfsspmdifd mffggggrma rerrgknvvh qlsvtledly ngvttklalq knvicekceg

vggkkgsvck cplckgrgmq ihlqqigpgm vqqiqtvck ckgqgerinp kdrccscsga kvckckkic
vhvcgmkdg qkllfhcgcd qcpcclpgdv iivldqkdhs vfgrrghdli mkmkiclsc lcgfkktikt
ldnrilvits kagcvikhgd lrcvrdegmp iykaplckgi liiqflvlfp ekhwlslekl pqleallppr qkvritddmd
qvelckfcpn eqnwrqhrc ycccdcgpa gvcqcta

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

[illegible]

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

mwesltldsg qisaltfrkl isqayevlsd pkkrdvydgg geqaikeggs gspssspmd ifdmffgggg
 rmarerrgkn vvhqlsvtle dlyngvttkl alqknvicek cegvggkkgg vekcplckgr gmqihqqig
 pgmvqqiqtv cieckgqger inpkdrlesc sgakvirekk iievhvekkm kdgqkilfhg egdqepelep
 gdviivldqk dhsvfqrrgh dlimkmkiql sealegfkkt iktldnrilv itskagevik hgdrlrcvrde gmpiykaple
 kgiliiqlv ifpekhwlsl eklpqleall pprqkvritd dmdqvelkef cpneqnwrqh reayededg
 pqagvqcqta

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

cagcggugcgcagcuccaggcccaugcacugaggaggcggaacaaggggagccccagagcuccaucaagccccucc
 aaaggcuccccuacccgguccacgccccccacccccuccccgcccucccccaauugugcauuuuugcagccggagg
 cggcuccgagauaggggcugugagcuucgcccggggagggggaaagagcagcgcaggagugaagcgggggggugggg
 ugaagggguuuggaauucggggcagggggcgacccccgucagcaggcccuccccaaggggcucggaacucuaaccuc
 uucacccacgccccugugcgcuuugccgaaggaaagaauaagaacagagaaggaggagggggaaaggaggaaaagg
 gggaccccccaacuggggggggugaaggagagaaguagcaggaccagagggggaaggggcugcugcuugcaucagcc
 cacaccaugcugacccccgcuugcuccugcugcugccccugcucucagcucugcugcggcgccgcuauccgacgcccc
 uaagacuugcagccccagcaguugccugcagagaucaaaauaaccuguaucuaaagggcgugcgaggcagggug
 agagggacugcccagacggauucgacgagggcccugagauuuguccacagaguaaggcccagcgaugccagccaaac
 gagcauaacugccugggauacugagcuguguguuuccaugucccgccucugcaauagggguccaggacugcauggacg
 gcucagaugagggggcccccagcggagagcuccaagggaacugcucucgcccugggcugccagcaccuugugucccc
 acacucgauggggccaccugcuacugcaacagcagcuuucagcuucaggcagauggcaagaccugcaaaagaauuuga
 ugagugcucaguguacggcaccugcagccagcuauccaccaacacagacggcuccuucuauguggcuguguugaag
 gauaccuccugcagccggauaacggcuccugcaaggccaagaacgagccaguagaccggccccucugcuguugaua
 gccaacucccagaacaucuuaggccacguaccugagugggggccaggugucuaccaucacaccuacgagcagcgggcag
 accacagccauggacuucagcuaucccaacgagaccguauugcgggugcauguuaggggacagugcugcucagacgca
 gcuaagugugcccgcaguccgcccuaaaggggcuucguggaugagcacaccaucaacaucuccucagucugcacc
 acguggaagcagauggccaucgacugggcagaggaacuucuaucuuuguggaugacaucgaugauaggauucuuugu
 cugcaacagaaauggggacacaugugucacauugcuagaccuggaacucuaacaacccccaaagggaauugcccuggacc
 ugccaugggggaagguguuuuucacugacuauagggcagaucaccaagguggaacgcugugacauggaugggcagaac
 cgcaccaagcucgucgacagcaagaauuguguuuccuauuggaucacgcuggaccugugcagccgcuugucuaucug
 ggcagaugccuauucggacuauauugaagugggagcuauagagggaaggggcgccagaccuaucauccaggggcaucc
 ugaauagcaccuguaacggccugacuguguuugagaauuauucuaugccaccaacucgggacaauugccaauugccag
 cagaagacgagugugaucggugugaaccgcuuaacagcaccgaguuacacccgggugggacaaggggug
 gugccuccacaucauccaccagaggcgucagccccgagugaggagccaugccugugaaaacgaccaguaugggaag
 ccgggugggcugcucugacaucugccugcugggccaacagccacaaggcgcgaccugccgcugccguuccggcuucag
 ccuggggcagugacgggaagucuaugcaagaagccggagcaugagcuguuccucuguauggcaaggggccggccaggc
 aucauccggggcauggauuagggggccaagguccggagagcacaugauccccauugaaaaccucaugaacccccg
 agcccuggacuuccacgcugagaccggcuucaucuaucuuugccgacaccaccagcuaccuauuggccgcagaaagau
 ugauggcacugagcgggagaccauccugaaggacggcauccacaauugggaggggugggccgugggacuggauggga
 gacaauucuguacuggacggacgauggggcccaaaaagacaauacgcguggccaggcugggagaaagcugcucagacccg
 caagacuuaauucgaggggcaaaugacacacccagggcuaauuguggggauccacuaauggguggauguaucugga
 cagacuggggaggaggacccccaggacagucggcguggggcgccugggagaggggcugggauuggauggcucacaccgaga
 caucuuugucaccuccaagacagugcuuuggcccaauagggcuaaggccuggaucuccggcugggcgccucuaucuggg
 uggauggccuucuaucgaccgcaucgagacgauacugcucaauggcacagaccgggaagauuguguaugaagguccugag
 cugaaccacgcccuuuggccugugucaccauggcaacuaccuucucuggacugaguauccggagugggcagugucuaac
 gcuuuggaacgggguguuaggaggcgacccccacugugaccuuucugcgagugagcgggcccccaucuuugagauc
 cgaauugauaugcccagcagcagcaaguuggcaccacaauauggccgggugaacaauaggcgccugcagcagccugug
 cuuggccaccccuggggagccgagugcgcugugcugaggaccagguguuggacgcagacggcgucacuugcuug

gcgaacccauccuacgugccuccaccccagugccagccaggcgaguuugccugugccaacagccgcugcauccaggag
 cgcuggaagugugacggagacaacgauugccugggacaacagugaugaggccccagcccucugccaucagcacaccug
 cccucgggaccgauucaagugcgcgagaacaaccggugcauccccaaccgcugggcucugcgcaggggacaauagacugug
 ggaacagugaagaugaguccaaugccacuuguucagcccgcaccugccccccaaccaguucuccugugccaguggc
 cgcugcauccccaucuccuggacgugugaucuggaugacgacuguggggaccgcucugaugagucugcuucgugug
 ccuaucacccaccugcuucccccugacucaguuuuaccugcaacaauuggcagauuguaucaacaucacugggagaugcgaca
 augacaauagacuguggggacaacagugacgaagccggcugcagccacuccuugcuuagcaccagauucaagugcaac
 agcggggcgugcauccccgagcacuggaccugcgauuggggacaauagacugcgagacuacagugaugagacacacgc
 caacugcaccaaccaggccacgaggccccucggugggcugccacacugaugaguuccagugccggcuggaugggacuau
 gcaucccccugcggugggcgugcgauuggggacacugacugcauggacuccagcgauagagaagagcugugaggggagu
 gaccacgucugcgauccagugucaaguuuuggcugcaaggacucagcucggugcaucagcaaaagcuggggugugu
 gaugggcacaauagacugugaggaauaacucggagcaggagaacucggagucccugggcugcagggcaccucgcaccc
 uugugccaacaacaccucagucugccugccccugacaagcugugugauggcaacgacgacugugggcgacggcucag
 augagggcgagcucugcgaccagugcucucugaauaacggugggcugcagccacaacugcucaguggcaccugggcgaa
 ggcauuguguguuccugcccucugggcauggagcugggggcccgacaaccacaccugccagauccagagcuacugugc
 caagcaucuaaaugcagccaaaagugcgaccagaacaaguucagcgugaagugcuccugcuacgagggcugggucc
 uggaaaccugacggcgagagcugccgcagccuggaccccucaagccguucaucauuuuccaaccgccaugaaauc
 cggcgcaucgaucuuacacaaaggagacuacagcguccugggugcccggccugcgcaacaccaucgcccuggacuuccac
 cucagccagagcgcccucucaguggaccgacgugggugggaggaagaucuaaccgggggaagcugcugggacaacgggagc
 ccugacuaguuucgagggugugauucagauugggcugggcacacccgagggccuggcuguaagacuggaauugcagggc
 aacaucaucugggugggagaguaaccuggaucagaucgaggugggcaagcuggaugggaccuccggaccaccucgu
 ggccggugacaauagagcaccgaagggaauucgacuggaucuccggggaugggaucucguuuuggacagacugggau
 gccagccugccccgcauugaggcgaccuccauggagugggggcugggcgccgaccgugcaccgggagaccggcucugg
 gggcugggcccaacgggcucaccguggacuaccuggagaagcgcauccuuuggauugacgccaggucagaugccauu
 uacucagcccguuacgacggcucugggcacauuggagggugcuucggggacacgaguuccugcgcacccguuugcag
 ugacgcuguaacggggggggaggucuaucugggacugacugggcgaacaaacacacuggcuaaggccaacaaguggaccggc
 cacaauugucaccgugguacagaggaccaacacccagcccuugaccugcaggguguaccacccucccgccagcccaug
 gcucccaaucccugugaggccaauggggggccaggggccucuccaccugugucucaucaacuacaaccggaccgu
 guccugcgccugccccaccucaugaagcuccacaaggacaacaccaccugcuauagauuuuagaaguuccugcugua
 cgcacgucagauggagauccgaggugugggaccuggaugcucccuacuacaacuacaucaucuccuacaggugcccg
 acaucgacaacgucacagugcuagacuacgaugcccgcgagcagcguguguaucugggucugacgugcggacacaggcc
 aucaagcggggccuucuaacaacggcacaggcgugggagacagucgucucugcagacuugccaaaugcccacgggcuggc
 uguggacugggucuccgaaaccuuguucuggacaagcuauagacaccaauaagaagcagaucuauguggcccggcugg
 auggcuccuucagaacgcagugggugcagggccugggagcagcccauugggccuugucuccaccucugcgugggaa
 gcucuacugggaccgauggugacaacaucagcauugccaacauggaugggcagcaaucgcaccucgucucuaugggcc
 agaagggccccguggggccuggcuaauagacuuccugaaagcaaacucuaucuggaucagcuccgggaaccuauaccauc
 aaccgcugcaaccuggauggggagugggcugggaggucaucgaugccaugcgagccagcugggcaaggccaccgccccu
 ggccaucaugggggacaagcugugggugggcugaucaggugucggaaaagauugggcacaugcagcaaggcugacggc
 ucgggcuccgugguccuucggaacagcaccaccucggugaugcacaugaaggucuaugacgagagcauccagcugga
 ccuaaagggcaccaaccucugcagugucaacaacggugacugcucccagcucugccugcccacgucagagacgaccgg
 cuccugcaugugcacagccggcuauagccuccggagugggcagcaggccugcgaggggcguagguuccuuuccucug
 uacucugugcaugagggaauacgggggaauucccuggaucccauagacaagucagaugccuugguccaguguccgg
 gaccucgucggcugucggcaucgacuuccacgcugaaaaugacaccaucuaucugggugggacauggggccugagcacga
 ucagccggggccaagcgggaccagacgugggcugaagacgugggugaccaauuggcuauggccgugugggagggaauugc
 aguggacuggaucgcaggcaacaucuaucuggcagaccagggcuuugaugucaucgaggucgcccggcucaauuggc
 uccuuccgcuacguggugaucuccaggggucuaagacaagccccggggcaucaccguccaccggagaaaggguacu
 guucuggacugaguggggucagauuccgcgaauugagcggucucggcuagauggcacgggagcgugugggucuggu

caacgucagcaucagcuggcccaacggcaucucaguggacuaccaggauagggaagcuguacuggugcgaugcacgga
 cagacaagaauugaacggauccgagacaggugagaaccgcgaggugguucuguccagcaacaacauaggacaug
 uuuucagugucuguguuugaggauuucacucacugggagugacaggacucaugccaacggcucuaucuaagcgcggga
 gcaaagacaaugccacagacuccgugccccugcgaaccggcaucggcguccagcuuaaagacaucuaaagucuaacc
 gggaccggcagaaaaggcaccaacgugugcgcgguggccaauggcgggugccagcagcugugccuguaccggggccg
 ugggcagcgggcccugcgcugugcccacgggaugcuggcugaagacggagcaucgugccgcgaguaugccggcuac
 cugcucuaucagagcgcaccuuucuaagagauccaccugucggauagcgcgaaccucaaugcgcccugcagccc
 uucgaggaccucugagcacaugaagaacgucacugcccuggccuuugacuaccgggcaggcaccucuccgggcacccc
 caaucgcaucuuucagcgacauccacuuugggaacauccaacagaucacacgacgauggcuccaggaggauccacau
 uguggaaaacgugggcuuccguggaaggccuggccuauaccgugggcugggacacucucuaauuggacaagcuacacg
 acauccaccaucacgcgccacacaguggaccagaccggcccagggggccuucgagcugagaccgucacuaugucu
 ggagauagaccaccacggggccuucguuuuggacgagugccagaaccucauguucuggaccaacugggaugagcagca
 ucccagcaucaugcggggcggcgcucucggggagccaauguccugaccuuauucgagaaggacaucgnaaccccaaug
 gccuggccaucgaccaccgugccgagaagcucuaucucugacgccaccucggacaagaucgagcggugcgaguu
 gacggcuccaccgcuaugugauccuaaagucagagccuguccaccuccuucggggcugggccguguauggggagcaca
 uuucuggacugacugggugcgggcgggcagugcagcgggccaacaagcacgugggcagcaacaugaagcugcugcg
 guggacaucuccccagcagcccauggggcaucaucgccgugggccaacgacaccaacagcugugaacucucuccaugccga
 aucaacaacgguggcugccaggaccugugucugcucacucaccagggccaugucaacugcucacugccgagggggccg
 aauccuccagggaugaccucaccugccgagcggugaauccucucugccgagcacaagaugaguuugagugugccaaug
 gcgagugcaucaacuucagccugaccugcgacggcgucuccccacugcaaggacaaguccgaugagaagccaucucua
 gcaacucccgccgcugcaagaagacuuuccggcagugcagcaauugggcgcuguguguccaacaugcuguggugcaac
 gggggccgacgacugugggggauggcucugacgagaucuccuugcaacaagacagccugugggugugggcgaguuccgc
 gccgggacgggaccugcaucgggaacuccagccgcugcaaccaguuuguggauugugaggacgccucagaugagau
 gaacugcagugccaccgacugcagcagcuacuuccggcugggcgugaaggggcugcucuaucagcccgagcgga
 ccucacucugcuacgcaccagcugggugugugauggcgccaauagacuguggggacuacagugaugagcgcgacug
 cccaggugugaaacgcccagaugccucugaauuacucuccugcccuagugggcgugcaucucccaugagcugga
 cgugugacaaagaggauagcugugaacauggcgaggacgagaccacugcaacaaguucugcucagaggcccaguuu
 gagugccagaaccaucgcugcaucuccaagcaguggcugugugacggcagcgauagcuguggggauggcucagacg
 aggcugcucacugugaaggcaagacgugcggccccuccuucuccugcccgacccacgugugcguccccgag
 cgcugggcucugugacggugacaaagacugugcugauggugcagacgagagcaucgcagcugguugcuuguacaaca
 gcacuugugacgaccgugaguucacugugccagaaccggcagugcaucccaagcacuucgugugugaccagaccgu
 gacugugcagauggcucugaugagucccccagugugaguacccgaccugcgggcccagugaguuccgcugugcca
 augggcgugugcugagcucccgccaguggggagugugauggcgagaauagcugccacgaccagagugacgagggcucc
 caagaaccacacugcaccagccaagagcacaagugcaaugccucgucacaguuccugugcagcaguggggcgugug
 uggcugaggcacugcucugcaacggccaggauagcugggcgacagcucggacgagcgugggcugccacaucaauga
 gugucucagcccgaagcucagugggcugcagccaggacugugaggaccucaagaucggcuucaaugcccgugucgcc
 cuggcuuccggcugaaggacgacggccggacgugugcugauguggacgagugcagcaccaccuuccccugcagccag
 cgcugcaucaacacuauggcagcuuaaagugucugugugugaggggcuauagcaccggcgggcgacccccacag
 cugcaaggcugugacugacgaggaaccguuucugaucuucgccaaccgguaucacugcgcaagcucaaccuggacg
 gguccaacuacacguuacuaaagcagggccugaacaacgccguugccuuggauuuugacuaccgagagcagaugauc
 uacuggacagaugugaccacccaggggcagcaugaucggaaggauagcaccuuaacgggagcaaugugcagguccuaca
 ccguacagggcucagcaaccccgaugggcuggcugugggacugggugggggaaccguacugggugcgacaaggc
 cgggacaccaucgagguguccaagcucaauuggggccuauccggacggugcugggucagcucugggccuccgugagccca
 gggcucugggugggauugcagaauuggguaccuguaucggacagacuggggugaccuacugaucggccgcau
 cggcauggauggguccagccgcagcugcaucgugggacaccaagaucacauggcccaauuggccugacgcuggacuau
 ucacugagcgcaucacugggggcagcggcgcgaggacuacauugaauuugccagccuggauggcuccaauccgccc
 guugugcugagccaggacaucggcacaucuuugcaguccuugaggacuacgucuaucuggaccgacuggg

aaacaaaguccauuaaccgagcccacaagaccacgggcaccaacaaaacgcuccucaucagcacgcugcaccggccccau
 ggaccugcaugucuucaugcccugcgccagccagacgugcccauaccccugcaaggucaacaugguggcugca
 gcaaccugugccugcugucccccgggggagggcacaaaugugccugcccaccaacuucuaaccugggcagcgauagg
 cgcaccuguguguccaacugcacggcuagccaguuuguaugcaagaacgacaagugcauucccuucugguggaagug
 ugacaccgaggacgacugcggggaccacucagacgagccccggacugcccugaguucaagugccggcccgacagu
 uccagugcuccacagguauucugcacaaaccugccuucacugcgauggcgacaauagacugccaggacaacagugac
 gaggccaacugugacauccacgucugcuugcccagucaguuaaaugcaccaacaccaaccgcuguauucccggauc
 uuccgcugcaauugggcaggacaacugcgaggauugggaggaugagaggggacugcccggaggugaccugcgccccaa
 ccaguuccagugcuccauuacaaacggugcauucccccgggucugggucugcgaccgggacaauagacugugggau
 ggagugaugagcccggcaacugcacccagauaccugugugugggacgaguuccgcugcaaggauucggggcgcu
 gcaucccagcgcuuggaagugugacggagaggauagacuguggggagggcucggauagagcccaagggaaguguga
 ugaacgcaccugugagccauaccaguuccgcugcaagaacaaccgcugcgugcccggccgugggcagugcgacuacg
 acaacgauugcgugugacaacuccgaugaagagagcugcaccccucggcccugcuccgagagugaguucuccugugcc
 aacggccgcugcaucgcggggcguggaaauugcgauggagaccacgacugcgcgagggcucggacgagaaagacug
 cccccccgcugugacauggaccaguuccagugcaagagcgggccacugcauuccccugcgugggcgugugacgag
 acggcgacugcauggacggcagcgacgaggaggccugcgccacugggcugcgggaccugccccugggacgaguuccag
 ugcaacaacaccuugugcaagccgcugggccuggaagugcgauggcgaggauagacuguggggacaacucagaugagaa
 ccccgaggagugugcccgguuucgugugcccucccaaccggccuuccguugcaagaauagaccgcgucugucugugg
 aucggggcgcaauugcgauggcacggacaacuguggggaggggacugaugaagaggacugugagccccccacagccca
 caccaccacugcgaagacaagaaggaguuucugugccggaaccagcgugccucuccuccuccugcgugcaacau
 guucgaugacugcggggacggcucugacgaggaggacugcagcaucgaccccaagcugaccagcugcgccaccaaug
 ccagcaucuguggggacgaggcacgcugcgugcgacccgagaaaagcgccuacugugccugccgcugggcuuccac
 accgugcccggccagcccgaugccaagacaucacagugccugcgcuucggcaccugcucccagcucugcaacaac
 accaagggcgccaccucugcagcugcgucggaaacuucaugaagacgcacaacaccugcaaggccgaaggcucugag
 uaccagguccuguaucgcugaugacaauagauccgcagccuguuccccggccacccccauucggcuuacgagca
 ggcauuccagggugacgagagugucccauugaugcuauuggauguccauucaaggcugccgugucuaauuggacc
 aacugggcacacggggcaccuucuccuaccgcagccugccaccugcugcgccuccuaccacuuccaaccggccaccggcga
 cagauugaccggggugucacccaccucaacauuucagggcgugaagaucccagaggcaucgccaucgacugggugggc
 cggaaacguguaucugggaccgacugggccgagauugauugaggugggcgagauagaaggggcgagaaccgcaagacg
 cucaucucgggcaugauugacgagccccacgccaauuguggggacccacugaggggggaccauguacuggucagacu
 ggggcaaccaccccaagauugagacggcagcgauuggaugggacgcuucgggagacacugggugcaggacaacauucag
 uggcccacagggccugggcguggaauuacacaauagagcggcuguaucugggcagacgccaagcuuucagucacggcag
 cauccggcucaauuggcacggacccccauugggcugcugacagcaaacgaggccuaagucaccccuucagcaucgacg
 ucuuugaggauuacaucauuggugucaccuacaucaauaauugugucuuaagaucuaaaguuugggcacagcccc
 uuggucaaccugacagggggccugagccacgcccucugacgugguccuuuaccuacagcacaaagcagcccgaagugac
 caaccuagugacggcaagaaugcgagugggcucugccugcugagccccagugggccugucugcaccugucccaaug
 ggaagcggcuggacaacggcacauugcgugccugugcccucuccaacgccccccagauugcucccgccuggaaccu
 guaaccugcagugcuuacacgguggcagcuguuuccucaaugcacggagggcagcccaagugccgcugccaaccccg
 uacacgggugacaagugugaacuggaccagugcugggagcagucgcaaugggggaccugugcugccuccccu
 cuggcaugcccacgugccggugcccacgggcuucacgggccccaaugcacccagcagguugugcgggcuacugu
 gccaacaacagcaccugcacuguaaccaggggcaaccagccccagugccgaugccuacccggcuuccugggcgaccgc
 ugccaguaccggcagugcucugggcuacugugagaacuuuggcacaugccagauggcugcugauggcuuccgacaau
 gccgcugcacugccuacuuugagggaucgaggugugaggugaacaagugcagccgcugucucgaaggggccugugu
 gguaacaagcagaguggggagucaccugcaacugcacggauggccgggugggccccagcugucugaccugcguc
 ggccacugcagcaauggcgccuccuguaaccaugaacagcaaaaugaugccugagugccagugcccacccccacaugaca
 gggccccggugugaggagcacgucuuacgcccagcagcagccaggacauauagccuccauccuaaucccuucugcuguu
 gcugcugcugcugguucugggggcgagugguauucugguauaagcgcgaguccaaggggcuagggcuucca

[illegible]

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

mltpplllll pllsalvaa idapktcspk qfacrdqite iskgwrcdge rdcpdgsdea peicpqskaq rcqpnehnci
gtelevpmsr lengvqdemd gsdegphcre lqgnscrige qhhevptldg pteycnssfq lqadgkckcd
fdecsvygtc sqlctntdgs ficgcvegyl lqpdnrcka knepvdrppv lliansqnil atylsgaavs titptstrqt
tamdfsyane tvcwvhvgds aaqtlkcar mpglkgfude htinislsh hveqmaidwl tgnfyfvddi
ddrifvcnrm gdtevtllld elynpkgial dpamgkvfft dygqipkver cdmdgqnrkt lvdsxivfph gitldlvsl
vywadayldy ievvdyegkg rqtiiqgili chlyglvtfe nlyatnsdn anaqqktsvi rvnrnfstey qvvtrvdkgg
alhiyhqrrq prvrshacen dqygkpggcs diellanshk artcrersgf slgsdgksek kpehelfly gkgrpgiirg
mdmgakvpde hmipienlmn praldhaet gfifyadts yligrqkidg teretilkdg ihnvegvavd
wmgdnlywtd dgpkktsiva rlekaaqrk tliegkmthp raivvdpng wmywtdweed pkdsrrgle
rawmdgshrd ifvtsktvlw pnglsldipa grlywvdafy drietilng tdrkivyegp elnhafgleh hgnylfwtey
rgsvyrler gvvgapptvt llrserppif eirmydaqqq qvgtnkervn nggcsslcla tpgsrqcaca edqvladagv
telanpsyvp ppqcqpgefa cansrcier wkcdgdndel dnsdeapalc hqhtepsdrf kcennrcipn
rwledgdndc gnsedesnat csartepnpq fscasgreip iswtcdlddd cgdrsdesas cayptcfplt qftenngrei
ninwrcdndn degdnsdeag cshscsstqf kensgreipe hwtdgdndc gdysdethan ctnqatppg
gchtdefqer ldglciplrw redgtdcmd ssdekcegv thvcdpsvkf gckdsarcis kawvcgdnd
cednsdeenc eslacrppsh pcantstvel ppdkledgnd degdgsdege ledqcslnng geshncsvap
gegivescpl gmelgpdnht cqiysycakh lkesqkedqn kfsvkcsye gvwlepdges crsldpfkpf
iifsnrheir ridlhkgdys vlvpglrnti aldfhlsqsa lywtdvvedk iyrklldng altsfevviq yglatpegla
vdwiagniyw vesnldqiev akldgtlrrt llagdiehpr aialdprdgi lfwtwdasl pricaasmsg agrrtvhret
gsggwpnglt vdylekrilw idarsdaiys arydgsghme vlrghelsh pfavtlygge vywtdwrtnt
lakankwtgh nvtvqtrnt qpfdlqvyp srqpmapnpe eangggqpcs hlclinynt vsacaphlmk
lhkdntteye fkkfllyarq meirgvdda pyyniisft vpdidnvtvl dydareqrvy wsdvrtqaik rafingtve
tvvsadlpna hglavdwvsr nlfwtsydt nkkqinvarld gsfnnavvqg leqphglvvh plrgklywtd
gdnismanmd gsnrtllfsg qkgpvglaid fpesklywis sgnhtinren ldgsglevid amrsqlgkat
alaimgdklw wadqvsekmg teskadgs s vlrnsttlv mhmkvysedi qldhkgtnpe svnngdcsql
clptsettrs cmctagyslr sgqqacevg sfllysvheg irgipldpnd ksdlvpsvg tslavgidfh aendtiywd
mglstisrak rdqtwredvv tngigrvegi avdwiagniy wtdqgfdvie varlngsfry vvisqgldkp
raitvhpekg ylfwtewgqy priersldg tervvlvns iswpngisvd yqdglywcd artdkierid
letgenrevv lssnmmdmfs vsvfedfiyw sdrthangsi krgskdnatd svplrtgigv qlkdikvfnr
drqkgtvca vanggcqqlc lyrggrqrac acahgm laed gascreyagy llysertilk sihlsernl
napvqpfedp ehmknviala fdyragspg tpriffdsdi hfgniqqind dgsrritive nvgsveglay

hrgwdtlywt syttstirh tvdqtrpgaf eretvitmsg ddhprafvld ecqnlmfwtn wneqhpsimr aalsganvlt
 liekdirtpn glaidhraek lyfsdatldk ierceydgsh ryvilksepv hpfglavyge hifwtdwvrr avqrankhvg
 snmklrrvdi pqqpmgiav andtnscels perinnngc q dlcllthqgh vnscrrgri lqddlterav nsscraqdef
 ecangeceinf sltedgvphc kdkseckpsy cnsrckktf rqcengrevs nmlwengadd cgdgsdeipc
 nktacgvgef rcrdgtcign ssrenqfvd edasdemncs atdcassyfrl gvkglvfqpc ertsleyaps
 wvedgandeg dysderdepg vkrpreplny facpsgreip mswtedkedd cehgedethe nkfcseaqfe
 cqnhriskq wldgsddeg dgsdeaahce gktcgpssfs cpgthvevpe rwldgdgkdc adgadesiaa
 gclynstedd refmcqnrq ipkhfvcdhd rdcadgsdes peceyptcgp sefcangre lssrqwedg
 endchdqsde apknphctsq ehkcncassqf lcssgrevac allengqddc gdssdergch inecslrkl
 gesqdecdlk igfkrerpq frlkddgrtc advdecsttf pcsqreinth gsykclvege yaprggdphs ckavtdeepf
 lifanryylr klnldgsnyt llkqglnav aldfdyreqm iywtdvtqg smirrmlng snvqvlhrtg lsnpdglavd
 wvggnylwd kgrdtievsk lngayrtlv ssglrepl vdvqngyly wtdwgdhsl grigmdgssr
 svivdtkitw pngltldyvt eriywadare dyiefasldg snrhvlsqd iphifaltlf edyvywtdwe tksinrahkt
 tgtnktllis tlhrpmdlhv fhrlrqpdpv nhpckvnnng csncllspg gghkcacptn fylgsdgrtc vsnctasqfv
 ckndkcipfw wkcdteddeg dhsdeppdep efkcrpgqfq cstgictpa fiedgdndeq dnsdeanedi
 hvelpsqfkc tntnrcipgi frengqdneg dgederdepe vtcapnqfqc sitkreiprv wvcdrdndev
 dgsdepanct qmtcgvdefr ckdsgrcipa rwkedgeddc gdgsdepkee cdertcepyq frcknnrcvp
 grwqcdydn cgdnsdeese tprpcesef scangrciag rwkedgdhdc adgsdekdet predmdqfqc
 ksghciplrw rcdadadcmd gsdeeacgtg vrtcpdelfq cnntlckpla wkcdgeddeg dnsdenpeec
 arfvcppnrp frckndrvcl wigrqcdgtd ncdgtdced cepptahth ckdckefler nqrcslsslr
 cnmfddegdg sdeedcsidp kltsatnas icgdearevr tekaaycacr sgfhtvpgqp gcqdineclr
 fgtesqlenn tkggghlesca rnfmkthntc kaegseyqvl yiaddneirs lfpghphsay eqafqgdesv
 ridamdvhvk agrvywnwh tgitisyrlp paapptsnr hrrqidrgvt hlnisglkmp rgiaidwvag
 nvywtdsgrd vievaqmke nrktlismgi dephaiivdp lrgtmywsdw gnhpkietaa mdgtlretlv
 qdniqwptgl avdyhnerly wadaklsvig sirlngtdpi vaadskrgls hpfsidvfed yiygvtyinn rvfkikhfgh
 splvntgggl shasdvlyh qhkqpevtnp cdrkkcewlc llspsgpvct cpngkrldng tcvpvpstpt
 ppdaprpgtc nlqcfnggsc flnarrqpkc rcqprytdk celdqcwehc rnggtcaasp sgmptrcpt
 gftgpkctq vcagycanns tctvnqgnqp qrcrlpgflg drcqyrqcsq ycenfgtcqm aadgsrqrc
 tayfegsree vnkesreleg acvvnkqsgd vtencdgrv apseltevgh csnggsetmn skmmpecqcp
 phmtgprcee hvfsqqqpg hiasilipll llllvlvagv vfwykrvqg akqfghqrm ngamnveign
 ptykmyegge pddvglllda dfaldpdkpt nftnpvyatl ymgghgsrhs lastdekrel lgrgpedeig dpla

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

gcuggcggcggccgcccaggccggggccgcgcgccagccugagccccccccgcccggagcguacaccgaaccugc
 uugaaaugcagccgaggagccggggcgggcgggcagcggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcg
 ccgcccgaaggacucggaggcgugagacgcggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcg
 ggcccgcgauggccuccccgagccggggccucuccggcuucuggcgcugcugcugcugcugcugcugcugcugcugc
 gcugcagcuccagcaucucggcgggcagcggcugaucgcugcugcggcgccaaggcgccgaaggauugcgaaa
 aggaccaauuccagugccggaacgagcgcugcauccccucuguguggagauagcagaggacgaugacugcuuagac
 cacagcagcagaggacgacugccccagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
 gaacgguggaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuccgaugaguccgagggccacuugcaccaagcagg
 uguguccugcagagaagcugagcugugggaccaccagccacaaguguguaccugccucgugggcgugcgacgggga
 gaaggacugcggaggugagcggaugaggccggcgugcuaccuugugcgccccgcacgaguuccagugcgggcaac
 cgcucuggccugggccggcugugucgugcgcagggcgacgacgacugugugagcggcagcgaugagcgcggcugug
 cagacccggccugcggggccccgcgaguuccgcugcggcgggcggauggcgggcgggcgccugcaucccgagcgcugggu
 cugcgaccgccaguugacugcgaggaccgcucggacgagggcagccgagcucugcgggccguccggggccccggggcca
 cguccgcggcgccgcccugcgccaccgccuccagauccgucggcgagcgggcgagugcgugcaccugggcguggcgc

[illegible]

[illegible]

gucuggcggcgccgcggccagggcgggcgccgcgcgccagccugagccccgcggccggagcgcgacccaaccgaaccugc
uuugaaaugcagccgagggagccggggcgggcgccgagcggcgggcgggcgggcgggcgagcggcaaccccgggcg
ccgcgggcaaggacucggagggcugagacggcgggcgggcgggcgggcgagcgcggggcgccggagccccg
ggccccgccaugggcccucccgagccggggcccucuccggcuucugggcgugcugcugcugcugcugcugcugcugc
gucugcagcuccagcaucuuugcgggcgagcggcggaucggcgugcugcggcgccaaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccggaacgagcgugcauccccucugugugggagaugcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacggugggaagugugacggcgaggagggaguguccugaugggcuccgaugaguccgagggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcugugggaccaccagccacaaguguguuaccugccucgugggcgugcgacggggga
gaaggacugcgagggugggagcggaugaggccggcgugugcuaccugggcugaacgagugucugcacaacaauggcggc
ugcucacacaucugcacugaccucaagauugggcuuugaaugcacgugcccagcaggcuuccagcuccugggaccagaa
gaccugugggcgacauugaugagugcaaggaccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuu
aagugugagugcuaccucggcuacgagauggaccuacugaccaagaacugcaaggcugcugcugggcaagagcccauc
ccuaaauucacccaaccggcacgaggugcgagggaucgaccuggugaagcggaacuaauucacgccucaucccaugc
ucaagaauugcugggcacuagauugggauguugccaccaauucgaucuaucggugugaccucuccuaccguaagauc
uauagcgccuacauuggacaaggccagugaccgaaagagcaggaggguccucauugacgagcagauugcacucuccaga
gggcccuggcaguggacuggguccacaagcacauucacugggacugacucgggcaauaagaccaucucaguggccacag
uugauggugggcccgccgacgcacucucucacgcccguaacccugagaaacccggggcaucgcuguuagaccccuugcg
ggguucauguaauuggucugacuggggggaccaggccaaagauugagaaaucuggggcucaacggugugggaccggcaaa
cacugggugucagacaauuugaauuggcccaacggaaucaccucggauucugcugagccagcgcuuuguacugggguagac
uccaagcuacaccaacuguccagcauugacuucagugggaggcaacagaaagacgcugaucuccuccacugacuuccug
agccacccuuuugggaaugcuguguuugaggacaagguguuucuggacagaccuggagaacgaggccauuuucagug
caaaucgggcucaauuggccuggaaaucuccauccugggcugagaaccucaacaacccacaugacauugucaucuccaug
agcugaagcgaccaagagcuccagaugccugugagcugaguguccagccuaauaggaggcguguaauaccugugccu
uccugcuccucagauucuccagccacucucccaaguacacaugugccuguccugacacaauugggcuggguccagaca
ugaagaggugcuaccgagcaccucaauucuaaccucaacuacgacguuagcuucuaaccaugacgaggacaguaccugcca
ccacaagagccccgggaccaccguccacagaucaccuaccagaaccacagcacagagacaccaagccugacagcugc
agucccaagcucaguuaguguccccaggggcucccagcaucagcccgucuaaccuuaagcccugcaaccagcaaccacuc
ccagcacuaugcaaaugaagacaguaagaugggcucaacagucacugccgcuguuaucgggaucacuggcccauag
uggugauagcccuccugugcaugauggauaccugaucuggagaaacugggaagcggaagaacacaaaaagcaugaau

[illegible]

[illegible]

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

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcrnerci psvwrededd deldhsdedd
cpkktcadsd fitedngcih erwkedgeee cpdgsdesea tetkqvcpae klscgptshk cvpaswredg
ekdceggade agcatwlnecl hnnnggcsht ctdlkigfec ttpagfqlld qktegdidec kdpdacsqic
vnykgyfkce cypgyemdll tknckaaagk spsliiftrh evrridlvkr nysrlipmlk nvvaldveva
tnriywclds yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwvhkh iywtdsgnkt isvatvdggr
rtrlfsrnl epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksgl ngvdrqtlvs dniewpngit ldllsqrlw vdsklhlqss
idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrlngl eisilaenln nphdivifhe lkqprapdac
elsvqpnggc eylelpapqi sshspkytea cpdtmwlgpd mkrcyrapqs tsttlastm trtvpattrapgttvhrsty
qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lpsatsnhsq hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall cmsgyliwrn
wkrkntksmn fdnpvyrkt eededelhi grtaqighvy paaissfdrp lwaepclget repedpapal
kelfvlpgep rsqhlqlpkn plselpvvks krvalslodd glp

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

gcuaggcgccgcccagggccggggccgcgcgccagccugagccccgcccgccgagcgcucaccgaaccgucg
uugaaaugcagccgaggagccggggcgggcgccagcgggcgccggcgccggcgccgggggacgcggcaacccggcg
ccgcgggaaggacucggagggcgugagacgcggcgccggcgccggcgccggggagcgcggggcgcgccggccggagccccg
ggccccccaugggcccuccccgagccgggcccucuccggcuucugggcgucugcugcugcugcugcugcugcugcu
gcugcagcuccagcaucuugcgggcgccagcgccgugaucgcugcugggcgccaaagggccggccaaggauugcgaaa
aggaccaauuccagugccgggaacgagcgcugcaucccucuguguggagaucgcgacgaggacgaugacugcuuagac
cacagcgacgaggacgacugccccaagaagaccugugcagacagugacuucaccugugacaacggccacugcauccac
gaacgguggaagugugacggcgaggaggaguguccugauggcuuccgaugaguccgagggccacuugcaccaagcagg
uguguccugcagagaagcugagcuguggaccaccagccacaaguguguaccugccucugggcgucgcgacggggga
gaaggacugcgagggugggagcgggaugaggccggcgugugcuaccucacugggcaccugccguggggacgaguuccag
ugugggggaugggacauguguccuugcaaucaagcacugcaaccaggagcaggacuguccagaugggagugaugaag
cuggcugccuacaggggcuagaacgagugucugcacaacaauggcgccugcucacacaucugcacugaccucaagauu
ggcuuugaauugcacgugcccagcaggcuuccagcuccggaccagaagaccugugggcacaauugaugagugcaagga
cccagaugccugcagccagaucugugucaauuacaagggcuauuuuaagugugagugcuaccugggcuacgagaug

[illegible]

[illegible]

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

mglpepgplr llalllllll llllqlqhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqcnerci psvwrcdedd deldhsdedd
cpkktcadsd ftednghcih erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatslgte rgdefqcgdg tevlaikhcn qeqdcpdgsd eagclqglne clhnnggcsd
ictdlkigfe ctepagfql dqktegdide ckdpdacsqi cvnykgyfkc ecypgyemdl ltknckaaaag kspsliftnr
hevrridlvk mysrlipml knvvaldvev atriywdcl syrkiysaym dkasdpkeqe vlidqlhsp
eglavdwvhk hiywtsgnk tisvatvdgg rrrtlfsrnl sepraiavdp lrgfmywsdw gdqakieksg
lngvdrqtlv sdniewpngi tldllsqrlly wvdsklhqls sidfsggnrk tlisstdfs hpfgiavfed kvfwtdlene
aifsanrlng leisilaenl nnpdhvifh elkqprapda celsvqpngg ceylelpapq issshpkytc acpdtmwlgp
dmkrcyrdan edskmgstvt aavigiivpi vviallcmmsg yliwrnwkrk ntksmnfdnp vyrktteed
edelhigrt qighvyparv alsleddglp

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

gcuggcggcggccgcccagggccggggccgcgcgccagccugagccccccccgccgcccagcgcgucaccgaaccugc
uugaaaugcagccgaggagccggggccggcgccgcagcggcggcggcgccggcgccgggggcagcggcaacccccggcg

[illegible]

auguugugucacacuaacugauucugcucuuuuugucuuugucauucaaguuccguuagcuucuguaacgcggugccc
uuugcagucugggugucucuuccagagggcgaggggggucagggauggggugcugcaucucacuagcuauacugggauc
aucuugguaaacugaaaaccaaauugggacauuuuuaaaauacagugcacuguuucuagagagagauuaaaaucauuu
aaaaaaaa

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

mglpepgplr llalllllll llllqlhla aaaadpllgg qgpakdcekd qfqernerci psvwrcdedd deldhsdedd
cpkktcadsd ftdnghihi erwkcdgeee cpdgsdesea tctkqvcpae klscgptshk cvpaswrcdg
ekdceggade agcatlcaph cfqcgnscl aavfvcgdgd dcgdgsderg cadpacgpre frcggdggga
ciperwvcd r qfdcedrde aaelcgrpgp gatsapaaca tasqfacrsg ecvhlgwrcd gdrdckdksd
eadeplgter gdefqcgdgt cvlaikhcnq eqdcpdgsde agclqglnecl lhnnggeshi ctdlkigfec tcapgfllld
qktegdidec kdpdacsqic vnykgyfkec cypgyemdll tknckaaagk spsliftnrh evrridlvkr
nysrlipmlk nvvaldveva tnriywcdls yrkiysaymd kasdpkeqev lideqlhspe glavdwhkh
iywtdsgnkt isvatvdggr rrtlfsrnl epraiavdpl rgfmywsdwg dqakieksl ngvdrqtlvs
dniewpngit ldllsqrylw vdsklhlqlss idfsggnrkt lisstdflsh pfgiavfedk vfwtdlenea ifsanrlngl
eisilaenln nphdivifhe lkqprapdac elsvqpnggc eylelcpapqi sshspkytca cpdtmwlgpd
mkrcyrapqs tsttlastm trtvpattr pgttvhrsty qnhstetpsl taavpssvsv prapsispst lspatsnhsq
hyanedskmg stvtaavigi ivpivviall cmsgyliwrn wkrkntksmn fdnpvyrkt eededelhi
grtaqighvy parvalsled dglp

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

[illegible]

[illegible]

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

mtaasmgpvr vafvllalc srpavgqncs gpcrcpdepa prepagvslv ldgcgcerve akqlgelcte
rdpcdphkgl fcdfgspanr kigvctakdg apcifggtyv rsgesfqssc kyqcteldga vgcmplcsmd
vrlpsdcpf prrvklpgkc ceewvdepk dqtvgpala ayrledtfgp dptmirancel vqtnewsacs
ktegmistr vtndnasrl ekqsrlcmvr pceadleeni kkgkkeirtp kiskpikfel sgctsmktyr akfegvetdg
rectphrttt lpvefkepdg evmkknmfmf ktcachyncp gdndifesly yrkmygdma

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

agggaaggagggggugggccugaccccuggcagucccccucagccuuuucccaauugcuacuucucuggggucuc
agguccugcuugugcucagcuccagcucacugggcugggccaccgagacuucuggacaggaaacugcaccuuccucuc
ucccagcaaggggggucuccagagacugcccacccaggaagucugggugggcugggggaauuuggacagugccuugguaau
gaccaggggucuccaggaagagauugccuugugggcuggggggcccugugccugacauuccuccugacucugcgugga
gcugugggaagccagggcgacaggaugcaagcagccaggcccaggggaggcagcagcugcauccucagagagggaagcca
ggauugccccacucugcugggggguacugcaggggugggggcugggaggcugcagagcccacagcccugcucaccaggggc
agagccccuucagaacccacagagaucguccacaaaaagcggaaaaaaggggccagcccccaaaauugcuggggaacga
gcuaugcagcguguguggggacaagggccucgggcuuccacuacaauuguucugagcugcgaggggcugcaaggggauc
uuccggcgagcgucacuaagggagcgcacuacucugccacaguggcgggccacugccccauaggacaccuacauugcg
ucgcaagugccaggagugucggcuucgcaauugccgucaggcugggcaugcgggaggaguguguccugucagaagaa
cagaucggccugaagaaacugaagcggaagaggaggaacaggcucaugccacaucuccuugccccccaggggcuuccuca
ccccccaaaauccugccccagcucagcccggaaacaacuggggcaugaucgagaagcucgucgugcccagcaacagugu
aaccggcgucuccuuuucugaccggcuucgagucacgcuuugggcccauggcaccagauccccauagccgggaggcccc
ucagcagcgcuuugcccacuucacugagcugggccaucgucucugugcaggagauaguugacuugcuaaaacagcuac
ccggcuuccugcagcucagccgggaggaccagauugcccugcugaagaccucugcgaucgaggguaugcuucugga
gacauucgggagguacaaccucgggagugagagauacccuuccucaagggaauucaguuaaaccgggaagacuug
ccaaagcaggggcugcaagugggaauucauacccccauucgaguucuccagggccaugaaugagcugcaacucaa
gaugccgaguuugccuugcucacuugcuauucagcaucucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccaggu
agagaggcugcagcacauauguggaagcccugcaugccuacgucuccauccaccauccccaugaccgacugaugu
ucccacgggaugcuauugaaacuggugagccuccggaccucugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcg
cugcaggacaaaaagcucccaccgcugcucucugagauucgggaugugcacgaauagacuguucugucccauauuuu
cuguuuuucuuuggccggauggcugaggccuggguggcugccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaacauc
cugggagcuggggaaggagauccuccguggcacuuaaaagagagucaaaagggguugcgaguuuuguggcucacugagc
aguggagcccucgcuaacacugugcugugucugaagaucugcugaccccacaaacggauggggccugggggccacu
ugcacaggguucuccagagcccugcccacuccugccuccaccacuuccuguuuuuccacaggggccccagaaaaauuc
uccacugucaaaaaaaaaa

5

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

mslwlgapvp dippsavel wkpgaqdass qaqqgsscil recarmphsa ggtagvglea aeptalltra
eppsepteir pqkrkkgpap kmlgnelesv egdkasgfhy nvlsccegckg ffrsvikga hyichsgghe
pmdtymrrkc qecrlrkrq agmreecvls eeqirlkklk rqeeeqahat slpprasspp qilpqlspeq
lgmieklvaa qqcnrrsfs drlrvtpwpm apdphsrear qqrfahtel aivsvqeivd fakqlpgflq lsredqiall
ktsaievmll etsrrynpgs esitflkdfs ynredfakag lqvefinpif efsramnelq lndaefalli aisifsadrp

nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvsrltssv hseqvfalrl qdkklpplls eiwdvhe

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

aggaaaggaggggugggccugaccccucggcaguccccuccucagccuuucccaauugcuacuucucugggggcucc
agguccugcuugugcucagcuccagcucacugggcggccaccgagacuucuggacaggaaacugcaccuuccucuc
ucccagcaagggggucuccagagacugcccaccaggaagucugggugggccuggggauuuggacagugccuugguaau
gaccagggcuccaggaagagauguccuugugggcggggggcccccugugccugacauuccuccugacucugcggugga
gcuguggaagccagggcgacaggaucaagcagccagggccaggagcagcugcauccucagagaggaaagcca
ggauggccccacucugcugggggguacugcaggggugggggcugggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggc
agagccccuucagaaccacagagaucguccacaaaagcggaaaaagggggccagcccccaaaugcuggggaacga
gcuaugcagcuguguggggacaaggccucgggcuuccacuacaauugucugagcugcgaggggcugcaagggaauuc
uuccggcgagcugcaucaaggggagcgcacuaucucugccacagugggcgccacugccccauggacaccuacaugcg
ucgcaagugccaggagugucggcuucgcaauugccgucagggcugggcagcgggaggaguguguccugucagaagaa
cagaucggccugaagaaacugaagcggcaagaggaggaaacaggcucaugccacaauccuugccccccaggggcuuccua
cccccccaauuccugccccagcucagcccggaaacaucggggcaugaucgagaagcucgucgucggccagcaacagugu
aaccggcgucuccuuucugacgggcuucgagucacggugaugcuucugggagacauucggaggguacaaccucggga
gugagaguaucaccuuccucaaggauuucaguuuaaccgggaagacuugccaaagcaggggucgaaguggaaauuc
aucaaccuccauucgaguucuccagggccauagaugagcugcaacucaaugaugccgaguuugccuugcucauugc
uauagcaucuuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauauggg
aagcccugcaugccuacgucuccauccaccuucccaugaccgacugauguuccacgggaugcuauagaacucgguga
gccuccggaccucagcagcuguccacucagagcaaguguuugcacugcgucugcaggacaaaaagcucccaccgcug
cucucugagauucgggaugugcacgaauagacugucucccauauuuucuguuuucuuugggccggaugggcugag
gccuggguggcugccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaaacauuccugggagcuggggcaaggagaucucc
cguggcuuuaaagagagucuaaaggguugcgaguuuugggcuacugagcagugggagccucgcuaacacugugcu
gugucugaagaucugcugaccccacaaacggauggggccugggggccacuugcacaggguucuccagagcccugcc
cauccugccuccaccacuuccuguuuuuccacagggggcccaagaaaaauuccacugucaaaaaaaaaa

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

mslwlgapvp dipdsavel wkpgaqdass qaaggsscil reearmpha ggtagvglea aeptalltra
eppsepteir pqkrkkpap kmlgnelesv cgdkaagfhy nvlscgckg ffrsvikga hyichsgghe
pmdtymrrkc qecrlkrq agmreecvls eeqlrklkl rqeeeqahat slpprasspp qilpqlspeq
lgmicklva qqqcnrrsfs dlrvtvml etsrrynpgs esitflkdfs ynredfakag lqvefinpif efsramnelq
lndaefalli aisifsadrp nvqdqlqver lqhtyvealh ayvsihhphd rlmfprmlmk lvsrltssv hseqvfalrl
qdkklpplls eiwdvhe

5

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

aucuuacuuaaggaccugcuggggugcggggaaaaggcgagucucggugggauugcugcaggaggggucguggu
cuggcugugggcgaggagcauaagaagacucugcgugggagcuguggaagccaggcgacaggauagcaagcagcca
ggcccaggggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggauagccccacucugcugggggguacugcaggggug
gggcugggaggcugcagagcccacagcccugcucaccaggggcagagcccccucagaaccacagagaucguccacaa
aagcggaaaaagggggccagcccccaaaugcuggggaacgagcuauagcagcuguguggggacaaggccucgggcuu
ccacuacaauugucagcugcgaggggcugcaagggaauucuccggcgagcugcaucaaggggagcgcacuaucuu
gccacagugggcgccacugccccauaggacaccuacaugcgucgcaagugccaggagugucggcuucgcaauugccgu
caggcugggcaugcgggaggaguguguccugucagaagaacagaucggccugaagaaacugaagcggcaagaggagga
acaggcucaugccacaauccuugccccccaggggcuuccuaccccccaaaucugccccagcucagcccggaaacaac
gggcaugaucgagaagcucgucgucgucggccagcaacaguguaaccggcgucuccuuuucugaccggcuucgagucacgc
cuuggcccaugggcaccagaucucccauagccggggaggcccgucagcagcguuugcccauucacugagcuggccauc

gucucugugcaggagauaguugacuugcuaaacagcuacccggcuuccugcagcucagccgggaggaccagauug
 ccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacaucucggagguaacaaccugggagugagaguau
 caccuuccucaaggauuucaguuaaaccgggaagacuugccaaagcagggcugcaaguggaaaucaucaacccca
 ucuucgaguucuccagggccaugaugagcugcaacucaaugcggaguuugccuugcucuaugcuaucagcau
 cuucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugcagcacacauauguggaagcccugc
 augccuacgucuccauccaccaucccaugaccgacugauguuccacggaugcuaugaaacuggugagccuccgg
 accugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcugcugcaggacaaaaagcucccaccgcugcucucuga
 gaucuggggaugugcacgaugacuguuucugucccauauuuucuguuuuucuggccggauggcugaggccuggug
 gcugccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaaacauuccugggagcugggcaaggagauccucccguggcau
 uaaaagagagucaaaagggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagcccucgcuaacacugugcugugucuga
 agaucaugcugaccccacaaacggauggggccugggggccacuugcacaggguucuccagagcccugcccacuccgc
 cuccaccacuuccuguuuuuccacagggccccaagaaaaauuccacugucaaaaaaaaaa

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

mphsaggtag vgleaaepta lltraeppse pteirpqrkr kgpapkmIGN elsvcgdka sgfhynvlsc
 egckgffrrs vikgahyich sghcpmdty mrrkcqecrl rkcrqagmre ecvlseeqir lklklrqeee
 qahatslppr assppqilpq lspeqlgmie klvaaqqqn rrsfdrllrv tpwpmaphdph srearqqrfa hftelaivsv
 qeivdfakql pgflqlsred qiallksai evmlletsrr ynpgsesitf lkdfsynred fakagllqvef inpifefsra
 mnelqlndae falliaisif sadrpnvqdq lqverlqhty vealhayvsi hhphdrImfp rmlmklvslr tlssvhseqv
 falrlqdkkl ppllseiwdv he

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

gauucuaacuuagcuaagcaaugcuacuggagaccuaggcaagccaagguacagcuucagggaagucuuugguga
 gcccacucucacuuaccaagguaacgaagcgacagacuccggggccgggugggcggaucaccaccagguucacgccg
 agaaggagcugggaggagagccgcccggcuccagccggaccgcuugcccgcacacaccguuguaaucauagcagcaaa
 caagcuggaacccgcugggguggcaccugcaagcagccgcccggacgcacccacucugcggugggagcuguggaagcca
 ggcgcacaggaucaagcagccaggcccaggaggcagcagcugcauccucagagaggaagccaggauccccacuc
 ugcugggggguacugcaggggugggggcugggaggcugcagagcccacagcccugcucaccagggcagagcccccua
 gaaccacagagaucgguccacaaaagcggaaaaaaggggccagcccccaaaugcuggggaacgagcuaugcagcgug
 ugugggggacaaggccucgggcuuccacuacaauuucugagcugcgaggggcugcaagggauucuccgcgcagcg
 ucaucaagggagcgcauacauucgcccagugggcgccacugccccauggacaccuacauugcugcgaagugccag
 gagugucggcuucgaaaugccgucagggcugggcaugcgggaggaguguguccugucagaagaacagauccggcuga
 agaaacugaagcggcaagagggaacaggcucaugccacauccuugccccaggggcuuccuaccccccaaauc
 ugccccagcucagcccggaaacacuggggcaugaucgagaagcugcugcugcccagcaacaguguaaccggcgucucc
 uuuucugaccggcuucgagucacgcuuuggcccauaggcaccagauccccauagccgggaggcccugcagcagcgcuu
 ugcccacuuacugagcugggccauugcucugugcaggagauaguugacuugcuaaacagcuacccggcuuccugc
 agcucagccgggaggaccagauugcccugcugaagaccucugcgaucgaggugaugcuucuggagacauucggag
 guacaacccugggagugagagauacaccuuccucaaggauuucaguuaaaccgggaagacuugccaaagcagggc
 ugcaaguggaaaucaucaaccccauucgaguucuccagggccaugaugagcugcaacucaaugaugccgaguuu
 gccuugcuaauugcuaucagcauucucugcagaccggcccaacgugcaggaccagcuccagguagagaggcugca
 gcacacauauguggaagcccugcaugccuacgucuccauccaccaucccaugaccgacugauguuccacggauugc
 aaugaaacuggugagccuccggaccugagcagcguccacucagagcaaguguuugcacugcugcagggacaaaa
 agcucccaccgcugcucucugagauucggggaugugcacgaugacuguuucugucccauauuuucuguuuuucugg
 ccggauggcugaggccuggguggcuccuccuagaaguggaacagacugagaaggggcaaacauuccugggagcuggg
 caaggagaucuccccguggcauuuuuagagagucaaaagggguugcgaguuuuguggcuacugagcaguggagcccuc
 gcuaacacugugcugugucugaagaucugaccccacaaacggauggggccacuugcacagggguu

cuccagagcccugcccauccugccuccaccacuuccuguuuuucccacagggccccaagaaaaauucccacugucaa
aaaaaaa

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

mqqtswpnplg gtcqpppgtr hsavelwkpg aqdassqaqg gsscilreea rmphsaggtg vvgleaaept
alltraepps epteirpqkr kkgpapkmlg nelcsvegdk asgfhynvls cegckgffir svikgahyic
hsgghcpmdt ymrrkcqecr lrkerqagmr eecvlseeqi rlkkklrquee eqahatslpp rassppqilp
qlspeqlgmi eklvaaqqqc nrrsfdrlr vtpwpmadp hsrearqqr ahftelaivs vqeidvfakq lpgflqlsre
dqiallksa ievmlletsr rynpgsesit flkdfsynre dfakagqlve finpifefsr amnelqlnda efalliaisi
fsadrpnvqd qlqverlqht yvealhays ihhphdrimf prmlmklvsl rtlssvhseq vfairlqdkk lpllseiw
vhe

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

[illegible]

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

msspttssld tlpngngppq pgapsssptv keegpepwpqg gpdpdvpgtd eassacstdw vipdpeepe
rkrkkgpap kmlghelercv gdkasgfhy nvlscgckgf frsvvrgga rryacrgggt cqm dafmrrk
cqqlrkrck eagmreqcvl seeqirkkki rkqqqqesqs qsqspvgpqg sssasgpga spggseagsq
gsgegegvql taaqlmiqq lvaqlqcnk rsfsdqpkvt pwplgadpqg rdarqqrfah ftelaiisvq

eivdfakqvp gflqlgredq iallkastie imlletarry nhetecitfl kdflyskddf hraglqvefi npifefsrar
rrlglddaey alliaifis adrpnvqepg rvealqppyv eallsytrik rpqdlrfrp mmlklvsrlt lssvhseqvf
alrlqdkklp pllseiwvhd e

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

ucgucaaguucacgcuccgccccucuccgacgugacgcaaggcgggguugccggaagaaguggcgaaguac
uuuugaggguuuuagaguagcgggcgugugucaggggcuaaagaggaggacgaagaaaagcagagcaagggaaccc
agggcaacaggaguaguucacuccgcgagagggcguccacgagacccccgcgcgagccaugagccccgccccgcg
guugcuuggagagggggcgggaccugagagagggcugcuccgugaccccaccauguccucuccuaccagaguuccc
uggauacccccugccugggaaauggccccccucagccugggcgccccuucuuucacccacuguaaaggaggagggu
ccggagccgugggcggggguccggaccugaugucccaggcacugaugaggccagcucagccugcagcacagacug
ggcgguccuuucugaagaacagaucgggaagaagaauucggaaacaacagcagcaggagucacagucacagucgc
agucaccugugggggcgagggcagcagcagcucagccucugggcguggggcuuccccugggggaucugaggcagg
cagccaggggcuccggggaaggcgaggguguccagcuaacagcgccucaaagaacuaugauccagcaguuggugggcg
gccccacugcagugcaacaacgcuccuuccgaccagcccaagucacgcccugggccccugggcgagacccccag
ucccgagaugcccgcagcaacgcuuugcccacuuacggagcugggccaucaucucaguccagggaucguggacu
cgcuagaagaguccugguuuccugcagcugggcgggaggaccagaucgcccuccugaaggcauccacuaucgaga
ucaugcugcuagagacagccagggcguacaaccacgagacagaguguaucaccuucuaagaggaucacuaacagca
aggagcaguccaccgugcagggcugcaggggaguucaucaaccccaucucgaguuucgcggggccaugcgggcg
cugggccugggagcagcugagucgcccugcuaucgccaucacuuucgcccagccggcccaacgugcagga
gcccggcgcgugggagggcuugcagcagccuacgugggaggcgugcuguccuacacgcgcaucaagaggccgcag
gaccagcugcgcuuuccgcgcaugcucaugaagcugugagccugcgacgcugagcucugugcagcugggagcagg
ucucgcccucgcgccuccaggacaagaagcugccgcucugcugcggagauccugggagcuccacagagugaggggc
uggccacccagccccacagccuugccugaccaccuccagcagauagacgcccgcacccuuccucuuuccuagggugg
aagggggccugggccgagccuguaagaccuacggcucuaucuuugggauaagcccaguccaggguccaggaggcu
cccuccugcccagcgagucuuccagaaggggugaaaggguugcaggucccgaccacugaccuucccgccugcccu
cccuccccagcuuacaccucaaagcccagcagcagucacuuugaacagaggggaggggagggacccauggcucuccccc
cuagcccgggagaccaggggccuuccucuuuccugcucuuaauuaaauaaaaacuaaaaaacagaacaggaaaauaaa
uaugaaucuaucagcccgagcugggagugca

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

msspttssld tlpngnppq pgapssstpv keegpepwpq gpdpdvpgtd eassacstdw gvlseeqirk
kkirkqqqqe sqsqsqspvg pqgssssasg pgaspggsea gsqgsgegeg vlqtaaqelm iqlvaqlq
cnkrfsdqp kvtpwplgad pqsrdarqr fahftelaii svqeivdfak qvpgflqlgr edqiallkas tieimlleta
rrynheteci tflkdflysk ddhfraglv efinpifefs ramrrlgldd aeyalliaifisadrpnvq eprgvealqq
pyveallsyt rikrpqdlr frmlmklvs lrtlssvhse qvfalrlqdk klpllseiw dvhe

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

GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGGCUCUCA AUGUGUACAGU
AGUCUGCACAUUGGUUAGGC

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

AGGAAGCUUCUGGAGAUCUGCUCGCCCCAGUGUUCAGACUACCUGU
UCAGGACAAUGCCGUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUGGGCAAG
GGAGAGCA

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

CGGGAAUGCCGCGGCGGGGACGGCGAUUGGUCCGUAUGUGUGGUGCCACCG
GCCGCCGGCUCCGCCCGGGCCCCCGCCCC

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

UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU
AGAUAACUAAAUCGACAACAAUACAGUCUGCCAU AUGGCACAGGCCAUG
CCUCUACAG

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

CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCCAUCUGGAAGACUAGUGAUUUUGU
UGUUGUCUACUGCGCUCAACAACAAUCCAGUCUACCUA AUGGUGCCAG
CCAUCGCA

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

AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGU
UGUUCUGAUGUACUACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGCAGACU
CCCUUCGAC

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

GATCCGACAGTAGCCTGCACATTAGTCACTTCCTGTCAGTAACCAATGTGCAG
ACTACTGTTTTTTGAATT

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

GATCCGCCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAGTCT
GA
ACACTGGGTTTTTTGAATT

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

GATCCGCGGCGGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC
CCGCCGTTTTTTGAATT

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

GATCCGTGGAAGATTAGTGAGTTTATTATCTTCCTGTCAGACAACAAAATCAC
TAGTCTTCCATTTTTGAATT

Los miembros de esta red pueden usarse como dianas para tratar melanoma metastásico. Además, los miembros pueden usarse como biomarcadores para determinar si un sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un melanoma metastásico o para determinar un pronóstico o seguimiento del paciente que tiene el trastorno. De acuerdo con esto, la presente 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.

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 apoEp1.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 hidroccloruros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar. Para ejemplos: la 4-hidroxiprolina puede sustituirse con prolina; la 5-hidroxilisina puede sustituirse con lisina; la 3-metilhistidina puede sustituirse con histidina; la homoserina puede sustituirse con serina; y la ornitina puede sustituirse con lisina. Los polipéptidos de la presente 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.

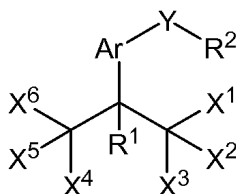
El término "elongación" se refiere a cualquier péptido objeto que tiene una secuencia de aminoácidos más larga por uno o más aminoácidos (bien en el extremo carboxi o amino terminal) que la de un péptido de la presente descripción. Preferiblemente, la elongación se produce en el extremo amino terminal. 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;

R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

-OH, -CO₂H, -O-alquilo(C₁-C₇), -OC(O)-, -alquilo(C₁-C₇), -O-heteroalquilo(C₁-C₇), -OC(O)-heteroalquilo(C₁-C₇), -NH₂, -NHalquilo(C₁-C₇), -N(alquilo(C₁-C₇))₂ y -NH-S(O)₂alquilo(C₁-C₅);

5 R² es un miembro seleccionado del grupo que consiste en

alquilo(C₁-C₇), heteroalquilo(C₁-C₇), arilo y arilalquilo(C₁-C₇);

X¹, X², X³, X⁴, X⁵ y X⁶ son cada uno independientemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

H, alquilo(C¹-C⁵), heteroalquilo(C¹-C⁵), F y Cl, con la condición de que no más de tres de X¹ a X⁶ son H, alquilo(C¹-C⁵), heteroalquilo(C¹-C⁵); e

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

-N(R¹²)S(O)_m-, -N(R¹²)S(O)_mN(R¹³)-, -N(R¹²)C(O)-, -N(R¹²)C(O)N(R¹³)-, -N(R¹²)C(S)- y -N(R¹²)C(O)O-;

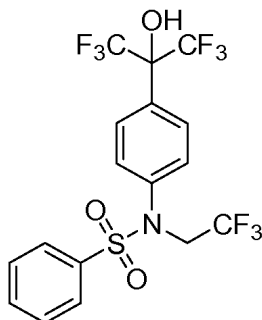
en donde R¹² y R¹³ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en:

H, alquilo(C₁-C₇), heteroalquilo(C₁-C₇), arilo y arilalquilo(C₁-C₇), y opcionalmente cuando Y es -N(R¹²)S(O)_m- o -N(R¹²)S(O)_mN(R¹³)-, R¹² forma un anillo de cinco o seis miembros fusionado a Ar o a R² a través de la unión covalente a Ar o a R², respectivamente; y el subíndice m es un número entero de 1 a 2;

con la condición de que cuando R¹ es OH, e -Y-R² es -N(R¹²)S(O)_m-R² o -N(R¹²)C(O)N(R¹³)-R² y está unido a una posición para respecto al carbono cuaternario unido a Ar, y cuando R² es fenilo, bencilo, o benzoilo, entonces i) al menos uno de R¹² o R¹³ es distinto de hidrógeno y contiene un sustituyente aceptor de electrones, o ii) R² está sustituido con un resto distinto de amino, acetamido, dialquil(C₁-C₇)amino, alquil(C₁-C₇)amino, halógeno, hidroxilo, nitro, o alquilo(C₁-C₇), o iii) la parte de anillo benceno de R² 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(R¹²)S(O)₂- y R¹ es OH.

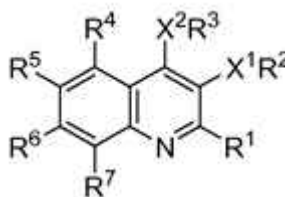
De acuerdo con esto, los compuestos de Fórmula I incluyen, pero no están limitados a, el compuesto con la estructura mostrada a continuación:



1

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

La Fórmula II se proporciona a continuación:



Fórmula II

en donde:

R¹ es -H;

X¹ es un enlace, alquilo C₁ a C₅, -C(O)-, -C(=CR⁸R⁹)-, -O-, -S(O)-, -NR⁸-, -CR⁸R⁹-, -CHR²³-, -CR⁸(CR⁹)-, -C(CR⁸)₂-,

-CR₈(OC(O)R⁹)-, -C=NOR⁹-, -C(O)NR⁸-, -CH₂O-, -CH₂S-, -CH₂NR⁸-, -OCH₂-, -SCH₂-, -NR⁸CH₂-, o



R² es H, alquilo C₁ a C₆, alqueno C₂ a C₆, alquino C₂ a C₆, cicloalquilo C₃ a C₆, -CH₂OH, arilalquilo C₇ a C₁₁, fenilo, naftilo, perfluoroalquilo C₁ a C₃, CN, C(O)NH₂, CO₂R¹² o fenilo sustituido independientemente con uno o más de los grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁ a C₃, alqueno C₂ a C₄, alquino C₂ a C₄, alcoxi C₁ a C₃, perfluoroalquilo C₁ a C₃, halógeno, -NO₂, -NR⁸R⁹-, -CN-, -OH, y alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 5 flúor, o R² 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 C₁ a C₃, alcoxi C₁ a C₃, perfluoroalquilo C₁ a C₃, halógeno, -NO₂, -NR⁸R⁹-, -CN, y alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 5 flúor;

X² es un enlace o -CH₂-;

R³ es fenilo, naftilo, o fenilo o naftilo sustituido independientemente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁ a C₃, hidroxilo, fenilo, acilo, halógeno, -NH₂-, -CN-, -NO₂-, alcoxi C₁ a C₃, perfluoroalquilo C₁ a C₃, alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 5 flúor, NR¹⁴R¹⁵-, -C(O)R¹⁰-, -C(O)NR¹⁰R¹¹-, -C(O)NR¹¹A-, -C≡CR⁸-, -CH=CHR⁸-, -WA-, -C≡CA-, -CH=CHA-, -WYA-, -WYNR¹¹-A-, -WYR¹⁰-, -WY(CH₂)_jA-, -WCHR¹¹(CH₂)_jA-, -W(CH₂)_jA-, -W(CH₂)_jR¹⁰-, -CHR¹¹W(CH₂)_jR¹⁰-, -CHR¹¹W(CH₂)_jA-, -CHR¹¹NR¹²YA-, -CHR¹¹NR¹²YR¹⁰-, pirrol, -W(CH₂)_jA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -W(CR¹⁸R¹⁹)A(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -(CH₂)_jWA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -CH=CHA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -C≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -W(CH₂)_jC≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, y -W(CH₂)_jZ, o R³ 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 C₁ a C₃, alcoxi C₁ a C₃, hidroxilo, fenilo, acilo, halógeno, -NH₂-, -CN-, -NO₂-, perfluoroalquilo C₁ a C₃, alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 5 flúor, -C(O)R¹⁰-, -C(O)NR¹⁰R¹¹-, -C(O)NR¹¹A-, -C≡CR⁸-, -CH=CHR⁸-, -WA-, -C≡CA-, -CH=CHA-, -WYA-, -WYR¹⁰-, -WY(CH₂)_jA-, -W(CH₂)_jA-, -W(CH₂)_jR¹⁰-, -CHR¹¹W(CH₂)_jR¹⁰-, -CHR¹¹W(CH₂)_jA-, -CHR¹¹NR¹²YA-, -CHR¹¹NR¹²YR¹⁰-, -WCHR¹¹(CH₂)_jA-, -W(CH₂)_jA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -W(CR¹⁸R¹⁹)A(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -(CH₂)_jWA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -CH=CHA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -C≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, -W(CH₂)_jC≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ-, y -W(CH₂)_jZ;

W es un enlace, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NR¹¹-, o -N(COR¹²)-

Y es -CO-, -S(O)₂-, -CONR¹³-, -CONR¹³CO-, -CONR¹³SO₂-, -C(NCN)-, -CSNR¹³-, -C(NH)NR¹³-, o -C(O)O-;

j es 0 a 3;

k es 0 a 3;

t es 0 a 2;

D es un enlace, -CH=CH-, -C≡C-, -C=C-, -C(O)-, fenilo, -O-, -NH-, -S-, -CHR¹⁴-, -CR¹⁴R¹⁵-, -OCHR¹⁴-, -OCR¹⁴R¹⁵-, o -CH(OH)CH(OH)-;

p es 0 a 3;

Z es -CO₂R¹¹-, -CONR¹⁰R¹¹-, -C(NR¹⁰)NR¹¹R¹²-, -CONH₂NH₂-, -CN-, -CH₂OH-, -NR¹⁶R¹⁷-, fenilo, CONHCH(R²⁰)COR¹²-, ftalamida, pirrolidina-2,5-diona, tiazolidina-2,4-diona, tetrazolilo, pirrol, indol, oxazol, 2-tioxo-1,3-tiazolinin-4-ona, aminas C₁ a C₇, aminas cíclicas C₃ a C₇, o alquilo C₁ a C₃ 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 -CO₂CH₃-, -CO₂H-, -COCH₃-, -CONH₂-, y -CN;

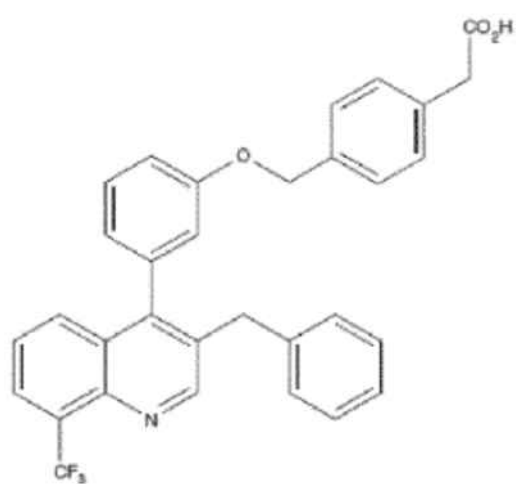
en donde dichas aminas C₁ a C₇ están sustituidas opcionalmente con uno a dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, halógeno, -OCH₃-, y -C≡CH;

en donde dicho fenilo está sustituido opcionalmente con CO₂R¹¹-, y en donde dichas aminas cíclicas C₃ a C₇ están sustituidas opcionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, -CH₂OH, alquilo C₁ a C₃, -CH₂OCH₃-, -CO₂CH₃-, y -CONH₂-, y en donde dicho oxazol está sustituido opcionalmente con CH₂CO₂R¹¹;

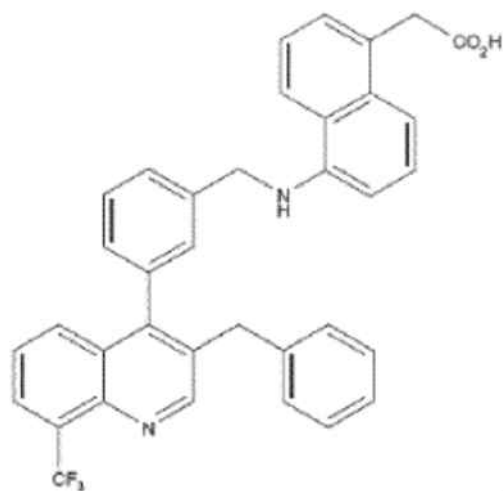
A es fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indano o bifenilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno a cuatro grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C₁ a C₃, alqueno C₂ a C₄, alquino C₂ a C₄, acilo, hidroxilo, halógeno, -CN-, -NO₂-, -CO₂R¹¹-, -CH₂CO₂R¹¹-, fenilo, perfluoroalcoxi C₁ a C₃, perfluoroalquilo C₁ a C₃, -NR¹⁰R¹¹-, -CH₂NR¹⁰R¹¹-, -SR¹¹-, alquilo C₁ a C₆ sustituido con 1 a 5 flúor, alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 2 grupos -OH, alcoxi C₁ a C₆ sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor, o fenoxi sustituido opcionalmente con 1 a 2 grupos CF₃; 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 C₁ a C₃, acilo, hidroxi, -CN, -NO₂, perfluoroalquilo C₁ a C₃, -NR¹⁰R¹¹, -CH₂NR¹⁰R¹¹, -SR¹¹, alquilo C₁ a C₃ sustituido con 1 a 5 flúor, y alcoxi C₁ a C₃ sustituido opcionalmente con 1 a 5 flúor;
- 5 R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno, independientemente, -H o -F;
- R⁷ es alquilo C₁ a C₄, perfluoroalquilo C₁ a C₄, halógeno, -NO₂, -CN, fenilo o fenilo sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C₁ a C₂ y OH;
- 10 con la condición de que si X₁R² forma hidrógeno, entonces R³ se selecciona de:
- (a) fenilo sustituido con -W(CH₂)_jA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -W(CR¹⁸R¹⁹)A(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -(CH₂)_jWA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -CH=CHA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -C≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, o -W(CH₂)_jC≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, en donde el resto fenilo está además sustituido opcionalmente con uno o dos grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁ a C₂, perfluoroalquilo C₁ a C₂, 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(CH₂)_jA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -W(CR¹⁸R¹⁹)A(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -(CH₂)_jWA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -CH=CHA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, -C≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ, o -W(CH₂)_jC≡CA(CH₂)_kD(CH₂)_pZ;
- cada R⁸ es independientemente -H, o alquilo C₁ a C₃;
- cada R⁹ es independientemente- H, o alquilo C₁ a C₃;
- 20 cada R¹⁰ es independientemente -H, -CH, alcoxi C₁ a C₃, alquilo C₁ a C₇, alqueno C₃ a C₇, alquino C₃ a C₇, cicloalquilo C₃ a C₇, -CH₂CH₂OCH₃, 2-metil-tetrahidro-furano, 2-metil-tetrahidro-pirano, 4-metil-piperidina, morfolina, pirrolidina, o fenilo sustituido opcionalmente con uno o dos grupos alcoxi C₁ a C₃, en donde dicho alquilo C₁ a C₇ está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de alcoxi C₁ a C₃, tioalcoxi C₁ a C₃, y CN;
- 25 cada R¹¹ es independientemente -H, alquilo C₁ a C₃ o R²²; o R¹⁰ y R¹¹, 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 C₁ a C₃, OH y alcoxi C₁-C₃; 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 C₁ a C₃, OH y alcoxi C₁-C₃;
- cada R¹² es independientemente -H, o alquilo C₁ a C₃;
- 30 cada R¹³ es independientemente -H, o alquilo C₁ a C₃;
- cada R¹⁴ y R¹⁵ es, independientemente, alquilo C₁ a C₇, cicloalquilo C₃ a C₈, alqueno C₂ a C₇, alquino C₂ a C₇, -CH, -F, arilalquilo C₇ a C₁₄, donde dicho arilalquilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de NO₂, alquilo C₁ a C₆, perhaloalquilo C₁ a C₃, halógeno, CH₂CO₂R¹¹, fenilo y alcoxi C₁ a C₃, o R¹² y R¹⁵ junto con el átomo al que están unidos pueden formar un anillo saturado de 3 a 7 miembros;
- 35 cada R¹⁶ y R¹⁷ es, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁ a C₃, alqueno C₁ a C₃, alquino C₁ a C₃, fenilo, bencilo o cicloalquilo C₃ a C₈, en donde dicho alquilo C₁ a C₃ está sustituido opcionalmente con un grupo OH, y en donde dicho bencilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos seleccionados de alquilo C₁ a C₃ y alcoxi C₁ a C₃; o R¹⁶ y R¹⁷, 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 C₁ a C₃, -OH, CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CO₂CH₃, y -CONH₂;
- 40 cada R¹⁸ y R¹⁹ es, independientemente, alquilo C₁ a C₃;
- cada R²⁰ es independientemente H, fenilo, o la cadena lateral de un alfa aminoácido natural;
- cada R²² es independientemente arilalquilo sustituido opcionalmente con CH₂COOH; y
- cada R₂₃ es fenilo;
- 45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

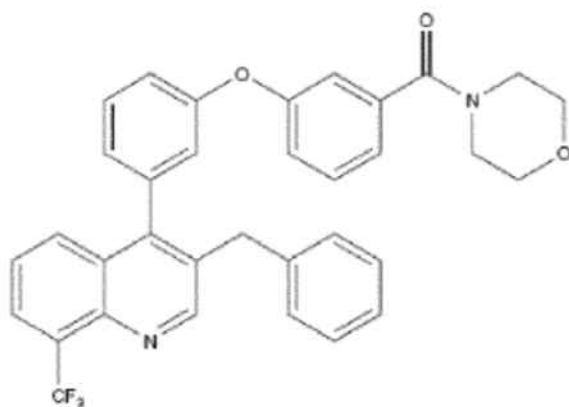
Los compuestos de Fórmula II pueden sintetizarse como se describe en la patente de EE.UU. No. 7.576.215. El compuesto de fórmula II puede ser cualquiera de los compuestos 26-32, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.



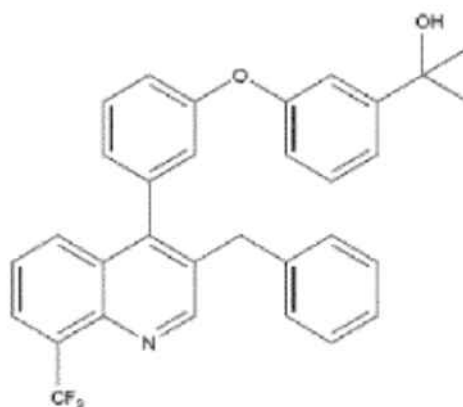
26



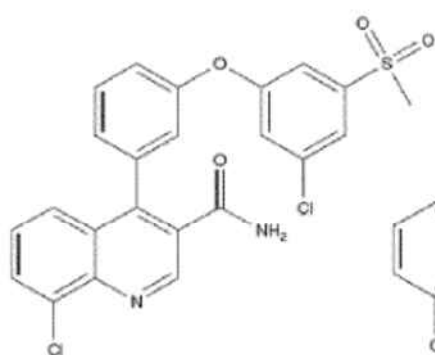
27



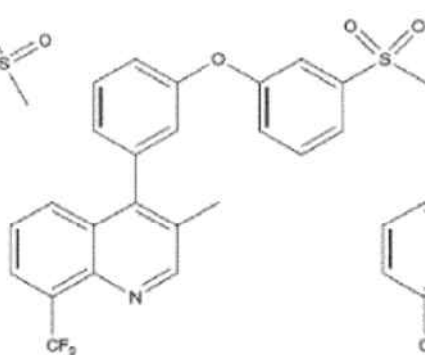
28



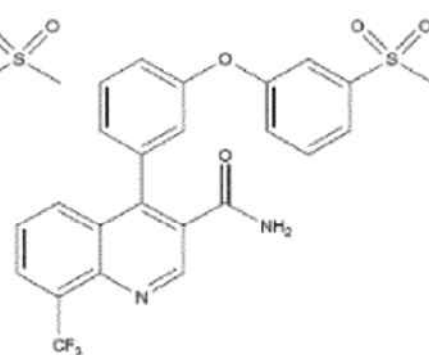
29



30

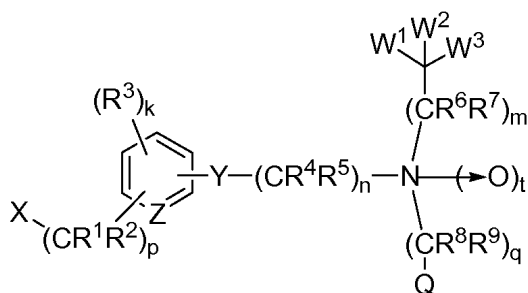


31



32

La Fórmula III se proporciona a continuación:



Fórmula III

en donde:

X se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₈, halo, -OR¹⁰, -NR¹⁰R¹¹, nitro, ciano, -COOR¹⁰, o -COR¹⁰.

5 Z es CH, CR³ o N, en donde cuando Z es CH o CR³, 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(R¹²)-, y -C(R⁴)(R⁵)-;

10 W¹ se selecciona de alquilo C₁-C₆, alquilo C₀-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo y Het, en donde dicho alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C₁-C₆, alquenoilo C₃-C₆, alquinoilo C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-SO₃H, -alquilo C₀-C₆-SO₂NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-SOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OC(O)NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-OC(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, y -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, donde dicho alquilo C₁-C₆, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

15 W² se selecciona de H, halo, alquilo C₁-C₆, alquenoilo C₂-C₆, alquinoilo C₂-C₆, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-NR¹³CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-Ar y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇, en donde dicho alquilo C₁-C₆ está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo, y en donde los restos cicloalquilo C₃-C₇, Ar y Het de dicho -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-Ar y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇ están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C₁-C₆, alquenoilo C₃-C₆, alquinoilo C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-SO₃H, -alquilo C₀-C₆-SO₂NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-SOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OC(O)NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-OC(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, y -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, donde dicho alquilo C₁-C₆, está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

30 W³ se selecciona del grupo que consiste en: H, halo, alquilo C₁-C₆, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-NR¹³CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₁-C₆-Ar y -alquilo C₁-C₆-cicloalquilo C₃-C₇, en donde dicho alquilo C₁-C₆ está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

35 Q se selecciona de cicloalquilo C₃-C₈, Ar y Het; en donde dicho cicloalquilo C₃-C₈, Ar y Het están opcionalmente no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C₁-C₆, alquenoilo C₃-C₆, alquinoilo C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-SO₃H, -alquilo C₀-C₆-SO₂NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-SOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OC(O)NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-OC(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, y -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, donde dicho alquilo C₁-C₆ está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;

40 p es 0-8;

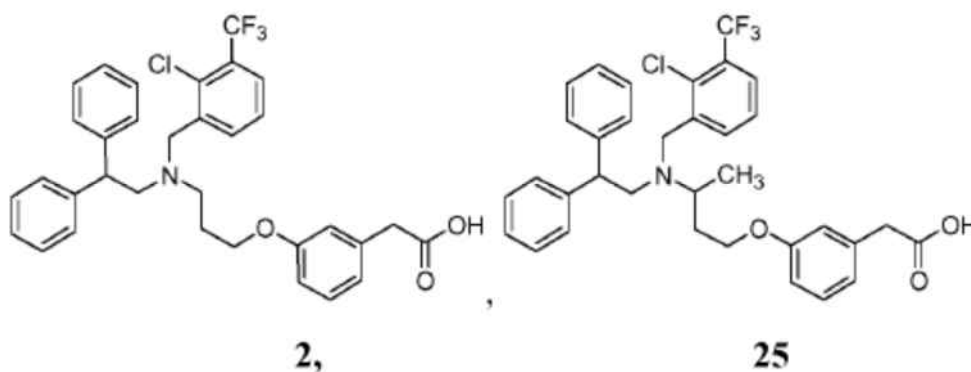
n es 2-8;

m es 0 o 1;

q es 0 o 1;

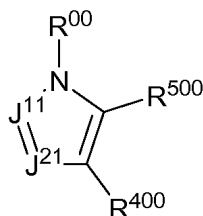
t es 0 o 1;

- 5 cada R¹ y R² se seleccionan independientemente de H, halo, alquilo C₁-C₆, alqueno C₃-C₆, alquino C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₁-C₆-Het, -alquilo C₁-C₆-Ar y -alquilo C₁-C₆-cicloalquilo C₃-C₇, o R¹ y R² 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 C₁-C₆ está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;
- 10 cada R³ es el mismo o diferente y se selecciona independientemente de halo, ciano, nitro, alquilo C₁-C₆, alqueno C₃-C₆, alquino C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-Ar, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₆-CO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-C(O)SR¹², -alquilo C₀-C₆-CONR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-COR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SR¹², -alquilo C₀-C₆-OR¹², -alquilo C₀-C₆-SO₃H, -alquilo C₀-C₆-SO₂NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-SO₂R¹², -alquilo C₀-C₆-SOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OCOR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-OC(O)NR¹³R¹⁴, -alquilo C₀-C₆-OC(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)OR¹⁵, -alquilo C₀-C₆-NR¹³C(O)NR¹³R¹⁴, y -alquilo C₀-C₆-NR¹³COR¹⁵, en donde dicho alquilo C₁-C₆ está opcionalmente no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes halo;
- 15 cada R⁴ y R⁵ se selecciona independientemente de H, halo, alquilo C₁-C₆, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-Ar y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇;
- R⁶ y R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C₁-C₆, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-Ar y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇;
- R⁸ y R⁹ se seleccionan cada uno independientemente de H, halo, alquilo C₁-C₆, -alquilo C₀-C₆-Het, -alquilo C₀-C₆-Ar y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇;
- 20 R¹⁰ y R¹¹ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C₁-C₁₂, alqueno C₃-C₁₂, alquino C₃-C₁₂, -alquilo C₀-C₈-Ar, -alquilo C₀-C₈-Het, -alquilo C₀-C₈-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₈-O-Ar, -alquilo C₀-C₈-O-Het, -alquilo C₀-C₈-O-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₈-S(O)_x-alquilo C₀-C₆, -alquilo C₀-C₈-S(O)_x-Ar, -alquilo C₀-C₈-S(O)_x-Het, -alquilo C₀-C₈-S(O)_x-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₈-NH-Ar, -alquilo C₀-C₈-NH-Het, -alquilo C₀-C₈-NH-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₈-N(alquilo C₁-C₄)-Ar, -alquilo C₀-C₈-N(alquilo C₁-C₄)-Het, -alquilo C₀-C₈-N(alquilo C₁-C₄-cicloalquilo C₃-C₇, -alquilo C₀-C₈-Ar, -alquilo C₀-C₈-Het y -alquilo C₀-C₈-cicloalquilo C₃-C₇, donde x es 0, 1, o 2, o R¹⁰ y R¹¹, 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 C₁-C₁₂, alqueno C₃-C₁₂, o alquino C₃-C₁₂ está sustituido opcionalmente con uno o más de los sustituyentes seleccionados independientemente del grupo halo, -OH, -SH, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -N(alquilo C₁-C₆ no sustituido)(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -O(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -CO₂H, -CO₂(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -CONH₂, -CONH(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -CON(alquilo C₁-C₆ no sustituido)(alquilo C₁-C₆ no sustituido), -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₆ no sustituido) y -SO₂N(alquilo C₁-C₆ no sustituido)(alquilo C₁-C₆ no sustituido);
- 30 R¹² se selecciona de H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₃-C₆, alquino C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-Ar, -alquilo C₀-C₆-Het y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇;
- 35 cada R¹³ y cada R¹⁴ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₃-C₆, alquino C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-Ar, -alquilo C₀-C₆-Het y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇, o R¹³ y R¹⁴ 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 R¹⁵ se selecciona de alquilo C₁-C₆, alqueno C₃-C₆, alquino C₃-C₆, -alquilo C₀-C₆-Ar, -alquilo C₀-C₆-Het y -alquilo C₀-C₆-cicloalquilo C₃-C₇;
- 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-, W¹ y W² son fenilo, W³ es hidrógeno, q es 1, y R⁸ y R⁹ son hidrógeno.
- 45 En otras realizaciones, X es hidrógeno, p es 0, t es 0, Z es CH, e Y es -O-, W¹ y W² son fenilo, W³ es hidrógeno, q es 1, R⁸ y R⁹ 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:



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

La Fórmula IV se muestra a continuación:



Fórmula IV

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

J¹¹ es -N= y J²¹ es -CR³⁰⁰-, o J¹¹ es -CR²⁰⁰- y J²¹ es =N-;

R⁰⁰ es G¹, G²¹, o R^N;

10 R²⁰⁰ es G¹, G²¹ o R^C;

R³⁰⁰ y R⁴⁰⁰ son independientemente R^C o Q, con la condición de que uno y solo uno de R³⁰⁰, R⁴⁰⁰, y R⁵⁰⁰ sea Q;

Q es cicloalquilo C₃₋₆, heteroarilo o heterociclilo, cada uno sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^Q, o Q es -X- Y-Z; en donde cada R^Q es independientemente arilo, arilalquilo, ariloxialquilo, arilalquilo C₀₋₆ carboxi, C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰)-COOH, oxo, =S, -Z, -Y'-Z, o -X- Y-Z, en donde cada R^Q está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R⁸⁰;

15 R⁵⁰⁰ es G¹, G²¹, Q, o R^C; con la condición de que solo uno de R⁰⁰, R²⁰⁰, y R⁵⁰⁰ sea G¹ y solo uno de R⁰⁰, N= y R⁵⁰⁰ sea G²¹;

G²¹ es -J⁰-K⁰, en donde J⁰ y K⁰ son independientemente arilo o heteroarilo, cada uno sustituido opcionalmente con uno a cuatro grupos R^K; cada R^K es independientemente hidrógeno, halógeno, CR¹¹⁰=CR¹¹⁰COOR¹¹⁰, nitro, -Z, -Y-Z, o -X-Y-Z;

20 G¹ es -L¹⁰- R, en donde L¹⁰ es un enlace, L⁵⁰, L⁶⁰, -L⁵⁰-L⁶⁰-L⁵⁰-, o -L⁶⁰-L⁵⁰-L⁵⁰-, en donde

cada L⁵⁰ es independientemente -[C(R¹⁵⁰)₂]_m-;

cada L⁶⁰ es independientemente -CS-, -CO-, -SO₂-, -O-, -CON(R¹¹⁰)-, -CONR¹¹⁰N(R¹¹⁰)-, -C(=NR¹¹⁰)-, -C(NOR¹¹⁰)-, -C(=N-N(R¹¹⁰)₂)-, -cicloalquilo C₃₋₈-, o -heterociclilo-, en donde el cicloalquilo o heterociclilo está sustituido opcionalmente con uno a 4 grupos R¹⁴⁰; o cada L⁶⁰ es independientemente aldiilo C₂₋₆-, en donde la cadena de aldiilo está interrumpida opcionalmente por -C(R¹⁰⁰)₂-, -C(R¹¹⁰)₂C(R¹¹⁰)₂-, -C(R¹¹⁰)C(R¹¹⁰)-, -C(R¹¹⁰)₂O-, -C(R¹¹⁰)₂NR¹¹⁰-, -C-, -O-, -S-, -N(RO)CO-, -N(R¹⁰⁰)CO₂-, -CON(R¹¹⁰)-, -CO-, -CO₂-, -OC(=O)-, -OC(=O)N(R¹⁰⁰)-, -SO₂-, -N(R¹⁰⁰)SO₂-, o -SO₂N(R¹⁰⁰)-

25 R es arilo, heterociclilo, heteroarilo o -cicloalquilo (C₃₋₆), en donde R está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^A, en donde cada R^A es independientemente halógeno, nitro, heterociclilo, alquilo C₁₋₆-, alqueno C₂₋₆-, alquino C₂₋₆-, cicloalquilo C₃₋₈-, (cicloalquilo C₃₋₈)-alquilo C₁₋₆-, (cicloalqueno C₃₋₈)-alquilo C₁₋₆-, (cicloalquilo C₃₋₈)-alqueno C₁₋₆-, arilalquilo, arilo, arilalcoxi C₁₋₆-, haloalquilo C₁₋₆-, SO₂R¹¹⁰, OR¹¹⁰, SR¹¹⁰, N₃, SOR¹¹⁰, COR¹¹⁰, SO₂N(R¹¹⁰)₂, SO₂NR¹¹⁰COR¹¹⁰, C≡N, C(O)OR¹¹⁰, CON(R¹¹⁰)₂-, CON(R¹¹⁰)OR¹¹⁰, OCON(R¹¹⁰)₂-, -NR¹¹⁰COR¹¹⁰, NR¹¹⁰CON(R¹¹⁰)₂,

- NR¹¹⁰COOR¹¹⁰, -C(=N-OH)R¹¹⁰, -C(=S)N(R¹¹⁰)₂, -S(=O)N(R¹¹⁰)₂, -S(=O)O¹¹⁰, -N(R¹¹⁰)S(=O)₂R¹¹⁰, -C(=O)N(R¹¹⁰)N(R¹¹⁰)₂, -OC(=O)-R¹¹⁰, -OC(=O)-OR¹¹⁰ o N(R¹¹⁰)₂, en donde cada R^A está sustituido opcionalmente con 1 a 4 grupos que son independientemente -halógeno, -alquilo C₁-C₆, ariloxi, alquilo C₀-C₆SO₂R¹¹⁰, alquilo C₀-C₆COOR¹¹⁰, alcoxi C₁-C₆ arilo, haloalquilo C₁-C₆, -SO₂R¹¹⁰, -OR¹¹⁰, -SR¹¹⁰, -N₃, -SO₂R¹¹⁰, -COR¹¹⁰, -SO₂N(R¹¹⁰)₂, -SO₂NR¹¹⁰COOR¹¹⁰, -C≡N, -C(O)OR¹¹⁰, -CON(R¹¹⁰)₂, -CON(R¹¹⁰)OR¹¹⁰, -OCON(R¹¹⁰)₂, -NR¹¹⁰COOR¹¹⁰, -NR¹¹⁰CON(R¹¹⁰)₂, -NR¹¹⁰COOR¹¹⁰, o -N(R¹¹⁰)₂;
- 5 R^N es -L³¹-R⁶⁰, en donde L³¹ es un enlace, -X³(CH₂)_n-X³, -(CH₂)_m-X³-(CH₂)_n o -(CH₂)_{1+w}, -Y³-(CH₂)_w, en donde cada w es independientemente 0-5: y cada X³ es independientemente un enlace, -C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)₂C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰), -C≡C-, -CO-, -CS-, -CONR¹⁰⁰, -C(=N)(R¹⁰⁰), -C(=N-OR¹¹⁰), -C[=N-N(R¹¹⁰)₂], -CO₂, -SO₂, o -SO₂N(R¹¹⁰); e
- 10 Y³ es -O-, -S-, -NR⁷⁰, -N(R¹⁰⁰)CO-, -N(R¹¹⁰)CO₂, -OCO-, -OC(=O)N(R¹⁰⁰), -NR¹⁰⁰CONR¹⁰⁰, -N(R¹¹⁰)SO₂, o -NR¹⁰⁰CSNR¹⁰⁰;
- o L³¹ es una cadena alidilo C₂₋₆ en donde la cadena alidilo está interrumpida opcionalmente por -C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)₂C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰), -C(R¹¹⁰)₂O-, -C(R¹¹⁰)₂NR¹¹⁰, -C≡C-, -O-, -S-, -N(R¹⁰⁰)CO-, -N(R¹⁰⁰)CO₂, -CON(R¹⁰⁰), -CO-, -CO₂, -OC(=O)-, -OC(=O)N(R¹¹⁰), -SO₂, -N(R¹⁰⁰)SO₂, o -SO₂N(R¹⁰⁰); y
- 15 R⁶⁰ es alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, cicloalquilo C₃-C₆, heteroarilo, heterociclilo, -CN, -C(=O)R¹¹⁰, -C(=O)OR¹¹⁰, -C(=O)N(R¹¹⁰)₂, -N(R¹¹⁰)₂, -SO₂R¹¹⁰, -S(=O)₂N(R¹¹⁰)₂, -C(=O)N(R¹¹⁰)N(R¹¹⁰)₂, o -C(=O)N(R¹¹⁰)(OR¹¹⁰), en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo, o heterociclilo está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R^{60a}, en donde cada R^{60a} es independientemente -Z, -Y'-Z, o -X-Y-Z;
- 20 cada R^C es independientemente -L³⁰-R⁷⁰, en donde cada L³⁰ es independientemente un enlace o-(CH₂)_m-V¹⁰-(CH₂)_n, en donde V¹⁰ es -C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)₂C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰), -C(R¹¹⁰)₂O-, -C(R¹¹⁰)₂NR¹¹⁰, -C≡C-, -O-, -S-, -NR¹⁰, -N(R¹⁰⁰)CO-, -N(R¹⁰⁰)CO₂, -OCO-, -CO-, -CS-, -CONR¹⁰⁰, -C(=N-R¹¹⁰), -C(=N-OR¹¹⁰), -C[=N-N(R¹¹⁰)₂], -CO₂, -OC(=O)-, -OC(=O)N(R¹⁰⁰), SO₂, -N(R¹⁰⁰)SO₂, -SO₂N(R¹⁰⁰), -NR¹⁰⁰CONR¹⁰⁰, -NR¹⁰⁰CSNR¹⁰⁰, cicloalquilo C₃-C₆, o ciclohaloalquilo C₃-C₆; o cada L³⁰ es independientemente alidilo C₂-C₆, en donde la cadena alidilo está interrumpida opcionalmente por -C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)₂C(R¹¹⁰)₂, -C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰), -C(R¹¹⁰)₂O-, -C(R¹¹⁰)₂NR¹¹⁰, -C≡C-, -O-, -S-, -N(R¹⁰⁰)CO-, -N(R¹⁰⁰)CO₂, -NR¹¹⁰, -CON(R¹⁰⁰), -CO-, -CO₂, -O(C=O), -O(C=O)N(R¹⁰⁰), -SO₂, -N(R¹⁰⁰)SO₂, o -SO₂N(R¹⁰⁰);
- 25 cada R⁷⁰ 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^{70a} en donde cada R^{70a} es independientemente ariloxi, aralquilo, ariloxialquilo, arilalquil C₀-C₆ carboxi, C(R¹¹⁰)=C(R¹¹⁰)COOH, oxo, -Z, -Y'-Z, o -X-Y-Z, en donde cada R^{70a} está sustituido opcionalmente con 1 a 4 R⁸⁰, y en donde cada R⁸⁰ es independientemente halógeno, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆(OR¹¹⁰), alquilo C₀-C₆OR¹¹⁰, alquilo C₀-C₆CON(R¹¹⁰)₂, alquilo C₀-C₆COR¹¹⁰, alquilo C₀-C₆COOR¹¹⁰, o alquilo C₀-C₆SO₂R¹¹⁰;
- 35 cada R¹⁰⁰ es independientemente -R¹¹⁰, -C(=O)R¹¹⁰, -CO₂R¹¹⁰, o -SO₂R¹¹⁰;
- cada R¹¹⁰ es independientemente -hidrógeno, -alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₁-C₆, -haloalquilo C₁-C₆, o -N(R¹²)₂, en donde cualquier R¹¹⁰ está sustituido opcionalmente con 1 a 4 radicales de R¹²⁰;
- 40 cada R¹²⁰ es independientemente halógeno, ciano, nitro, oxo, -B(OR¹³⁰), alquilo C₀-C₆N(R¹³)₂, haloalquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, (alquilo C₀-C₆)C=O(OR¹³⁰), alquilo C₀-C₆OR¹³⁰, alquilo C₀-C₆COR¹³⁰, alquilo C₀-C₆SO₂R¹³⁰, alquilo C₀-C₆CON(R¹³)₂, alquilo C₀-C₆CONR¹³⁰OR¹³⁰, alquilo C₀-C₆SO₂N(R¹³⁰)₂, alquilo C₀-C₆SR¹³⁰, haloalquilo C₀-C₆OR¹³⁰, alquilo C₀-C₆CN, -alquilo C₀-C₆N(R¹³)₂, -NR¹³SO₂R¹³, u -Oalquilo C₀-C₆COOR¹³⁰;
- cada R¹³⁰ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, o alquino C₂-C₆;
- cada R¹⁴⁰ es independientemente alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, halógeno, haloalquilo C₁-C₆, alquilo C₀-C₆CON(R¹¹⁰)₂, alquilo C₀-C₆CONR¹¹⁰R¹⁰, alquilo C₀-C₆OR¹¹⁰, o alquilo C₀-C₆COOR¹¹⁰; y
- 45 cada R¹⁵⁰ es independientemente hidrógeno, halógeno, OR¹³⁰, alquilo(C₁-C₆) o haloalquilo(C₁-C₆), en donde cada alquilo está sustituido opcionalmente con al menos un grupo que es cada uno independientemente halógeno, ciano, nitro, azido, OR¹³⁰, C(O)R¹³⁰, C(O)OR¹³⁰C(O)N(R¹³⁰)₂, N(R¹³⁰)₂, N(R¹³⁰)C(O)R¹³⁰, N(R¹³⁰)S(O)₂R¹³⁰, -OC(O)OR¹³⁰, OC(O)N(R¹³⁰)₂, N(R¹³⁰)C(O)OR¹³⁰, N(R¹³⁰)C(O)N(R¹³⁰), SR¹³⁰, S(O)R¹³⁰, S(O)₂R¹³⁰, o S(O)₂N(R¹³⁰)₂; o dos R¹⁵⁰ (unidos al mismo átomo o a átomos diferentes) pueden tomarse conjuntamente para formar un cicloalquilo C₃-C₆;
- 50 cada X es independientemente -O-, -S-, o -N(R¹⁰⁰);

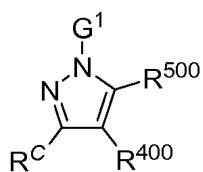
cada Y es independientemente $-\text{[C(R}^{150})_2]_p-$, o -alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$, en donde p es 1, 2, 3, 4, 5, o 6;

cada Y' es independientemente $-\text{[C(R}^{150})_2]_p-$, -alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$ cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, o heterociclilo, en donde el cicloalquilo o heterociclilo está sustituido opcionalmente con 1 a 3 grupos Z;

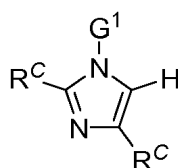
5 cada Z es independientemente -H, halógeno, $-\text{OR}^{110}$, $-\text{SR}^{110}$, $-\text{C(=O)R}^{110}$, $-\text{C(=O)OR}^{110}$, $-\text{C(=O)N(R}^{110})_2$, $-\text{N(R}^{100})_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{C(=N-OH)R}^{110}$, $-\text{C(=S)N(R}^{110})_2$, $-\text{CN}$, $-\text{S(=O)R}^{110}$, $-\text{S(=O)N(R}^{110})_2$, $-\text{S(=O)OR}^{110}$, $-\text{S(=O)}_2\text{R}^{110}$, $\text{S(=O)}_2\text{N(R}^{110})_2$, $-\text{NR}^{110}\text{COR}^{110}$, $-\text{N(R}^{110})\text{C(=O)N(R}^{110})_2$, $-\text{N(R}^{110})\text{COOR}^{110}$, $-\text{N(R}^{110})\text{S(=O)}_2\text{R}^{110}$, $-\text{C(=O)N(R}^{110})\text{N(R}^{110})_2$, $-\text{C(=O)N(R}^{110})(\text{OR}^{110})$, $-\text{OC(=O)-R}^{110}$, $-\text{OC(=O)-OR}^{110}$, o $-\text{OC(=O)-N(R}^{110})_2$; 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:

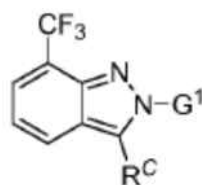


Fórmula V



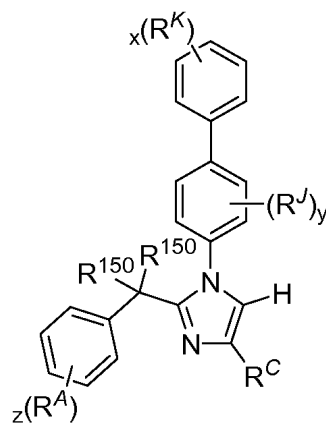
Fórmula VI

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



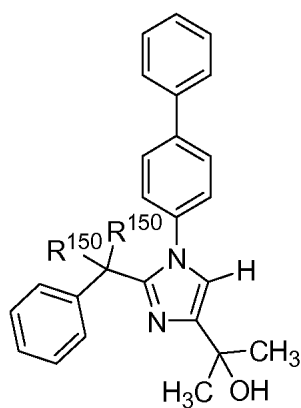
Fórmula VII

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



Fórmula VIII

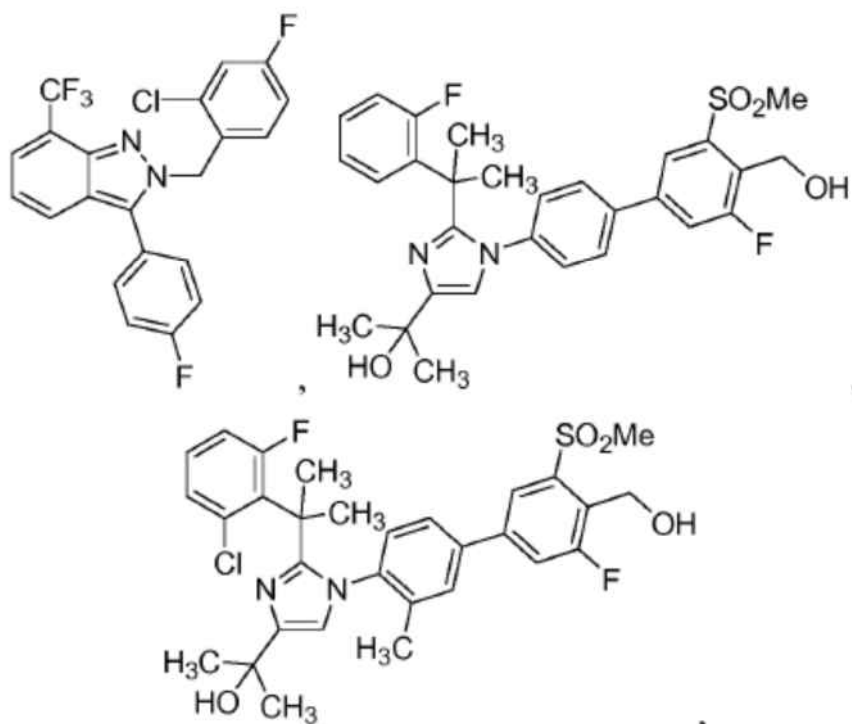
En más realizaciones adicionales, el compuesto de Fórmula VI tiene una estructura de Fórmula IX:



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:

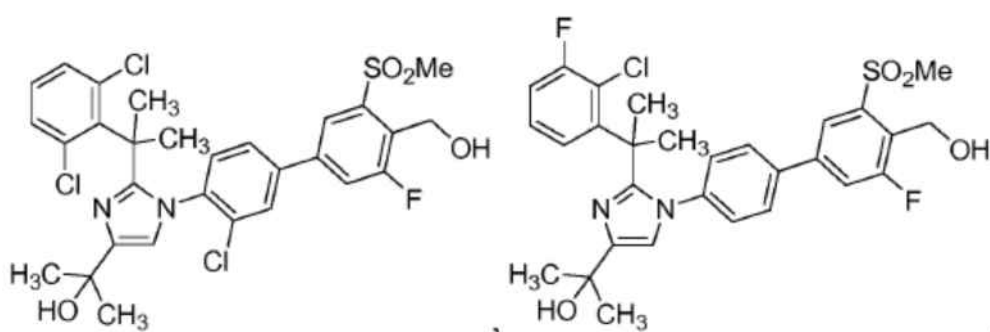
5



3

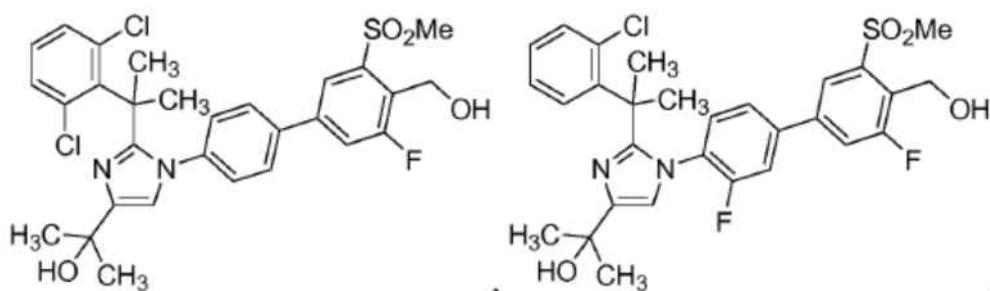
4

5



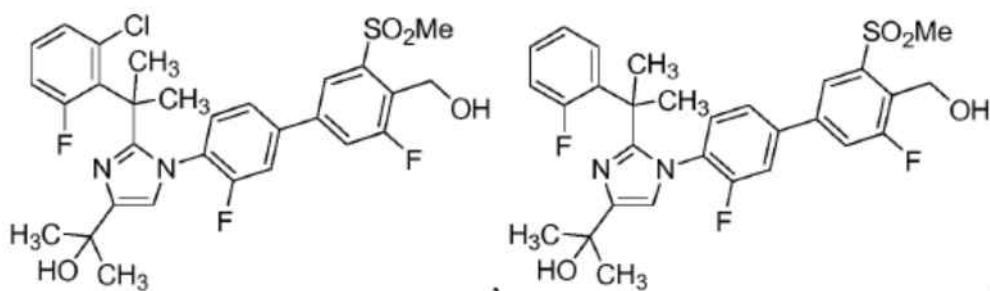
6

7



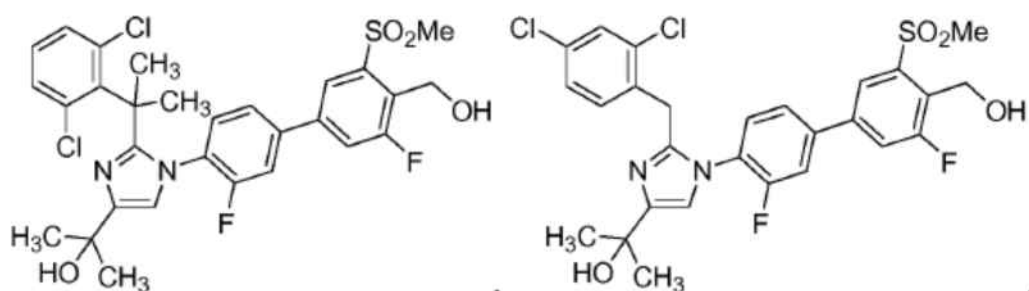
8

9



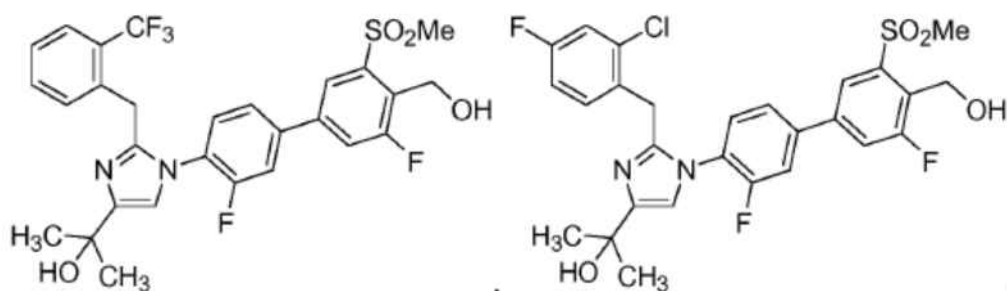
10

11

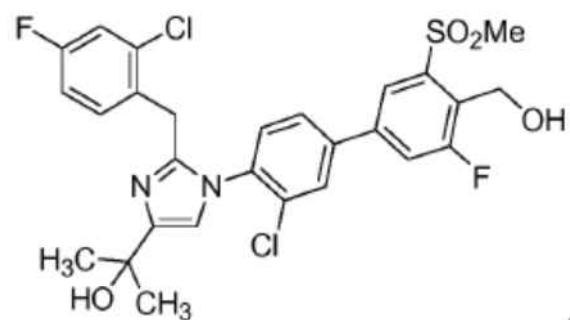


12

13

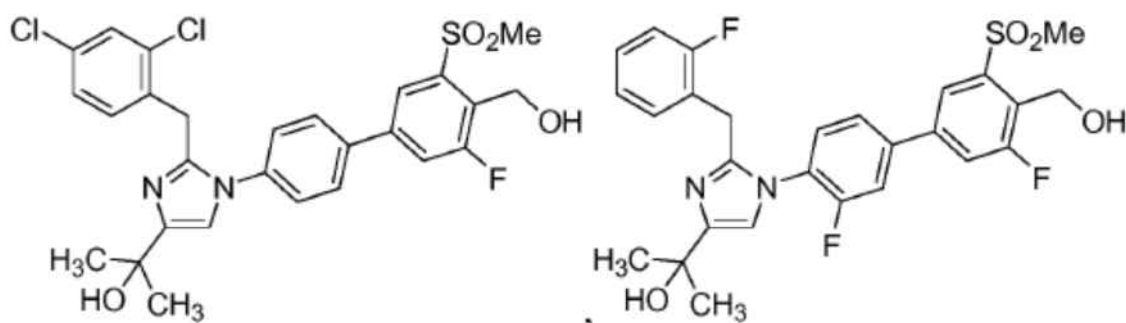


14

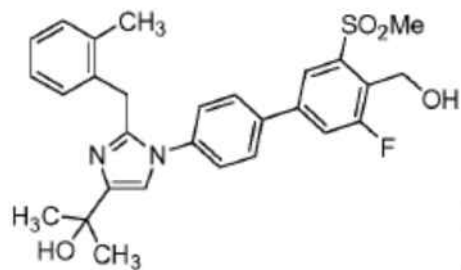


15

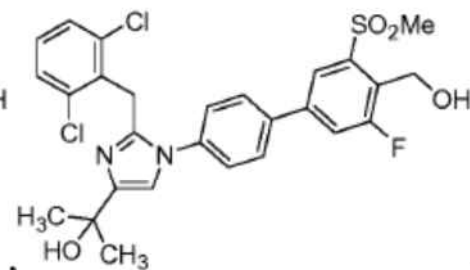
16



17

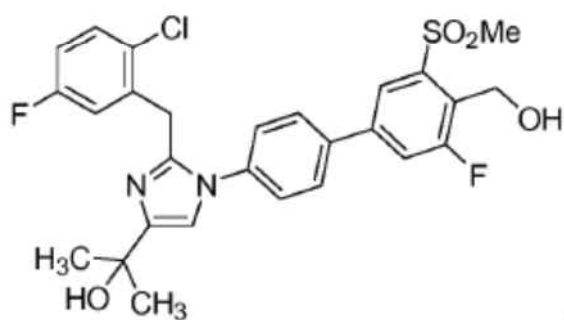


18

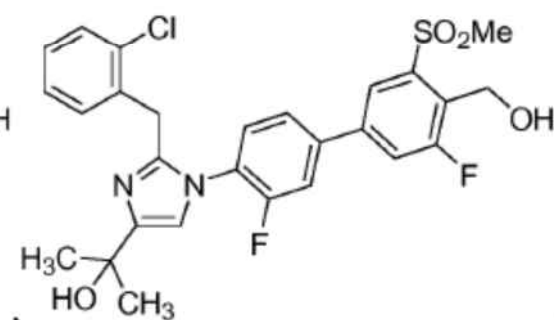


19

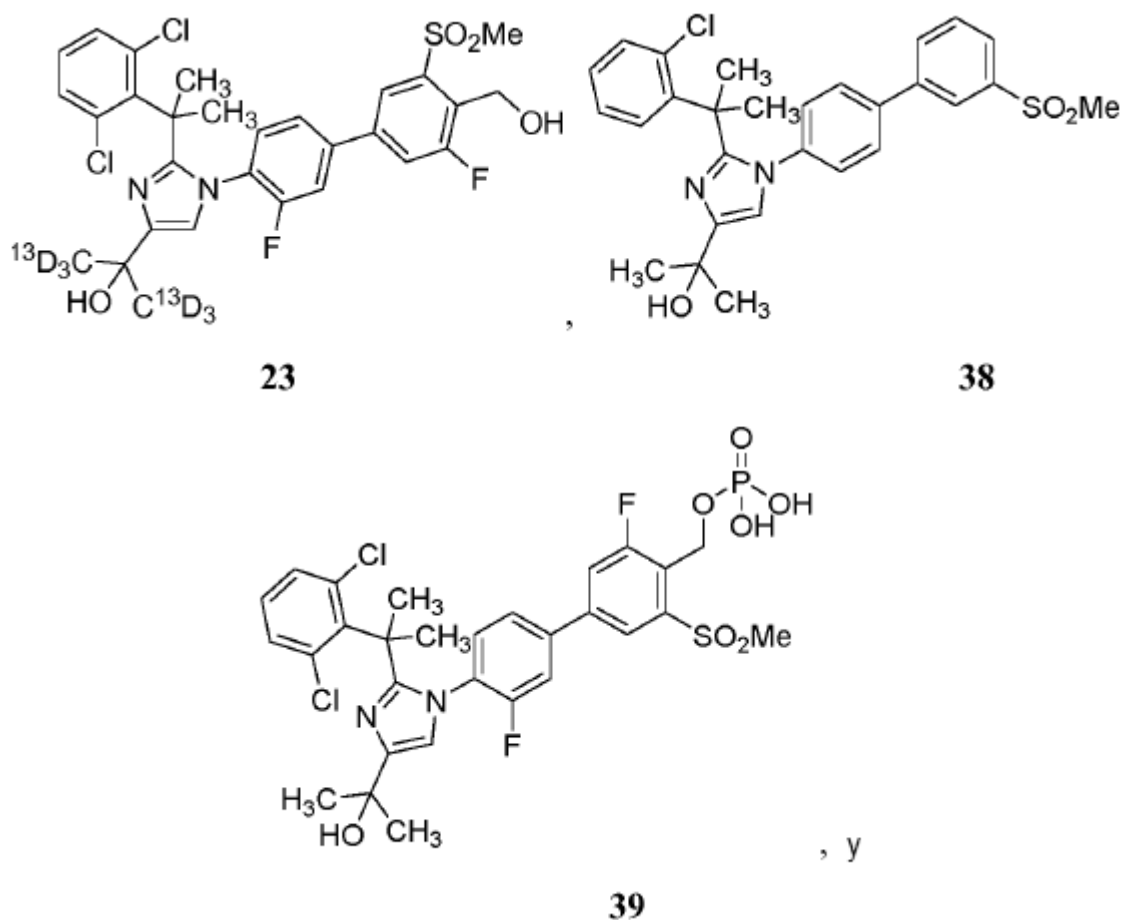
20



21



22

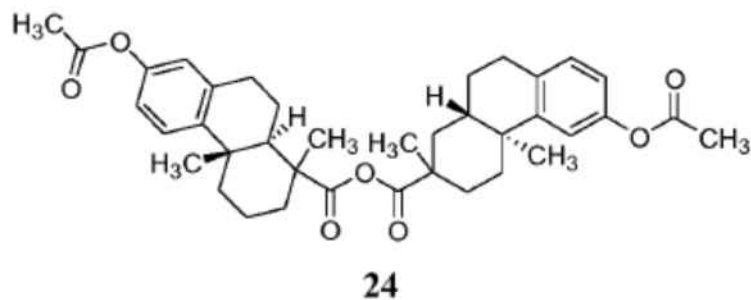


seleccionado de la lista que comprende:

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

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



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

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

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

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

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

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

Tal y como se usa en la presente memoria, la referencia a la actividad de un agonista de LXR en *LXRα* y *LXRβ* se refiere a la actividad como se mide usando el ensayo de detección de ligando (LiSA) descrito en Spencer et al. Journal of Medicinal Chemistry 2001, 44, 886-897. En algunas realizaciones, el agonista de LXR tiene una CE_{50} de menos de 1 μ M 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_{50} . Por ejemplo, GW3965 **2** tiene una actividad aproximadamente 6 veces mayor para *LXRβ* (CE_{50} = 30) comparado con *LXRα* (CE_{50} = 190).

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

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

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

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

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

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

- 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 acenafilo. 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, benzofurazano, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, furanilo, indolinilo, indolilo, indolazino, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftpiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolina, isoxazolina, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, 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; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)R_x; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x en donde cada aparición de R_x independientemente incluye, pero no está limitado a, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en la presente memoria pueden estar sustituidos o no sustituidos, ser ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en donde cualquiera de los sustituyentes aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, (alquil)arilo o (alquil)heteroarilo descritos anteriormente y en la presente memoria pueden estar sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará que cualesquiera dos sustituyentes adyacentes tomados conjuntamente pueden representar un sustituyente alicíclico o heterocíclico de 4, 5, 6, o 7 miembros sustituido o no sustituido. Los ejemplos adicionales de sustituyentes aplicables generalmente se ilustran por las realizaciones específicas mostradas a continuación.

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

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

El término "amino", tal y como se usa en la presente memoria, representa -N(R^{N1})₂, en donde cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de N, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterociclilo (p. ej., heteroarilo), alquilheterociclilo (p. ej., alquilheteroarilo), o dos R^{N1} se combinan para formar un heterociclilo o un grupo protector de N, y en donde cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo, o arilo. En una realización preferida, amino es -NH₂, o -NHR^{N1}, en donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo, o arilo, y cada R^{N2} puede ser H, alquilo, o arilo. El término "aminoalquilo", tal y como se usa en la presente memoria, representa un grupo heteroalquilo, como se define en la presente memoria, que se describe como un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, sustituido con un grupo amino, como se define en la presente memoria. El alquilo y amino pueden estar sustituidos

además cada uno con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente memoria para el grupo respectivo. Por ejemplo, el resto alquilo puede comprender un sustituyente oxo (=O).

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

Los sustituyentes opcionales típicos en grupos aromáticos o heteroaromáticos incluyen independientemente halo, CN, NO₂, CF₃, OCF₃, COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂, o NR'SO₂R', 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 (-N₃), nitro (-NO₂), 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 (-CO₂H), éster carboxílico (-CO₂R'), carbamoilo (-OC(=O)NR'R" o -NRC(=O)OR'), hidroxi (-OH), isociano (-NC), sulfonato (-S(=O)₂OR), sulfonamida (-S(=O)₂NRR' o -NRS(=O)₂R'), o sulfonilo (-S(=O)₂R), donde cada R o R' se selecciona, independientemente, de H, alquilo C1-C6 o heteroarilo, alquenilo C2-C6 o heteroalquenilo, alquinilo 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 retrolental de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, varias otras enfermedades y trastornos inflamatorios, y endometriosis.

Expresión forzada de supresores de la metástasis

Tanto los polipéptidos de los supresores de la metástasis mencionados anteriormente (p. ej., DNAJA4, ApoE, LRP1, LRP8, y LXR) como el ácido nucleico que codifica los polipéptidos pueden usarse para llevar a la práctica la 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 β (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en uno de los polipéptidos descritos anteriormente (p. ej., las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18) se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de las secuencias, tales como mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para determinar su capacidad de regular al alza la red mencionada anteriormente o ruta de señalización de ApoE/LRP, y desencadenar la respuesta celular respectiva para identificar mutantes que retienen la actividad como se describe más adelante en los ejemplos.

Un equivalente funcional de un polipéptido de esta 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).

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 endocitótica o independiente de receptor/energía. Hay varias clases de CPP con varios orígenes, de CPP totalmente derivados de proteínas a CPP quiméricos a CPP completamente sintéticos. Los ejemplos de CPP son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las Solicitudes de EE.UU. Nos. 20090099066 y 20100279918. Se sabe que los CPP pueden administrar una proteína exógena a varias células.

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

Para expresar los factores mencionados anteriormente, la 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 eucarionte de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión.

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

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

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

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

El vector que contiene las secuencias de ácido nucleico apropiadas como se ha descrito anteriormente, así como un promotor o secuencia de control apropiada, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese los polipéptidos descritos anteriormente. Dichos vectores pueden usarse en terapia génica. Los ejemplos de huéspedes de expresión adecuados incluyen células bacterianas (p. ej., *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*), células fúngicas (levadura), células de insecto (p. ej., *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda* (Sf9)), células animales (p. ej., CHO, COS, y HEK 293), adenovirus, y células de plantas. La selección de un huésped apropiado está en el alcance de los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la presente 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 policationes tales como polilisina que actúan como neutralizadores de carga del núcleo fosfato, o restos hidrofóbicos tales como lípidos (p. ej., fosfolípidos, colesterol, 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 colesterol o derivados de los mismos (p. ej., cloroformato de colesterilo, ácido cólico, etc.). Estos restos pueden estar unidos al ácido nucleico en el extremo 3' o 5' del mismo y también pueden estar unidos al mismo a través de una base, azúcar, o una unión de nucleósido intramolecular. Otros restos pueden ser grupos de recubrimiento específicamente situados en el extremo 3' o 5' del ácido nucleico para prevenir la degradación por nucleasas tales como exonucleasa, ARNasa, etc. Dichos grupos de recubrimiento incluyen, pero no están limitados a, grupos protectores de hidroxilo conocidos en la técnica, incluyendo glicoles tales como polietilén glicol, tetraetilén glicol y semejantes. La acción inhibidora del ADN antisentido puede examinarse usando un sistema de expresión génica basado en una línea celular o un animal de la presente 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
15 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
20 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
25 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
30 fosfolípidos ejemplares incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, y distearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de los liposomas también es posible sobre la base de, por ejemplo, especificidad de órgano, especificidad de célula, y especificidad de orgánulo y es conocido en la técnica.

- Cuando se usa *in vivo*, es deseable usar un sistema de administración-expresión reversible. Para este fin, puede usarse el sistema Cre-loxP o FLP/FRT y otros sistemas similares para la administración-expresión reversible de uno
35 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
40 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
45 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 ,
55 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
60

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 transcrómico 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 imaginaria 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 coaguligandos. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los

expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o rutas de administración de los varios agentes/terapias usados pueden variar.

En una estrategia *in vivo*, un compuesto o agente se administra a un sujeto. Generalmente, el compuesto se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como, por ejemplo, pero no limitado a, disolución salina fisiológica) y se administra oralmente o por infusión intravenosa, o se inyecta o implanta subcutáneamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, intrarrectalmente, intravaginalmente, intranasalmente, intragástricamente, intratraquealmente, o intrapulmonarmente.

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 fosfatidos 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.

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

Terapias de combinación

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

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

- 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	procarbazina
	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-fluorodesoxicitidina metotrexato tomudex fludarabina raltitrexed	trimetrexato desoxicoformicina pentostatina hidroxiurea decitabina (SuperGen) clofarabina (Bioenvision) irofulveno (MGI Pharma) DMDC (Hoffmann-La Roche) etinilcitidina (Taiho) gemcitabina capecitabina
Inhibidores de topoisomerasa	amsacrina epirubicina etopósido tenipósido o mitoxantrona 7-etil-10-hidroxi-camptotecina dexrazoxanet (TopoTarget) pixantrona (Novuspharma) análogo de rebecamicina (Exelixis) BBR-3576 (Novuspharma) rubitecán (SuperGen) irinotecán (CPT-11) topotecán	mesilato de exatecán (Daiichi) quinamed (ChemGenex) gimatecán (Sigma-Tau) diflomotecán (Beaufour-Ipsen) TAS-103 (Taiho) elsamitrucina (Spectrum) J-107088 (Merck & Co) BNP-1350 (BioNumerik) CKD-602 (Chong Kun Dang) KW-2170 (Kyowa Hakko) hidroxicamptotecina (SN-38)
Antibióticos antitumorales	valrubicina terarubicina idarubicina rubidazona plicamicina porfiromicina mitoxantrona (novantrona) amonafida	azonafida antrapirazol oxantrazol losoxantrona MEN-10755 (Menarini) GPX-100 (Gem Pharmaceuticals) Epirubicina mitoxantrona doxorubicina

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 de aromatasa	aminoglutetimida	YM-511 (Yamanouchi)
	atamestano (BioMedicines)	formestano
	letrozol	exemestano
	anastrozol	
Inhibidores de timidilato sintasa	pemetrexed (Eli Lilly)	nolatrexed (Eximias)
	ZD-9331 (BTG)	CoFactor™ (BioKeys)

Tabla 2		
Antagonistas de ADN	trabectedina (PharmaMar)	edotreótido (Novartis)
	glufosfamida (Baxter International)	mafosfamida (Baxter International)
	albúmina + ³² P (Isotope Solutions)	apaziquona (Spectrum Pharmaceuticals)
	timectacina (NewBiotics)	O6 bencil guanina (Paligent)
Inhibidores de farnesiltransferasa	arglabina (NuOncology Labs)	tipifarnib (Johnson & Johnson)
	lonafarnib (Schering-Plough)	alcohol perílico (DOR BioPharma)
	BAY-43-9006 (Bayer)	
Inhibidores de bombas	CBT-1 (CBA Pharma)	trihidrocloruro de zosuquidar (Eli Lilly)
	tariquidar (Xenova)	dicitrato de biricodar (Vertex)
	MS-209 (Schering AG)	
Inhibidores de histona acetiltransferasa	tacedinalina (Pfizer)	butirato de pivaloiloximetilo (Titan)
	SAHA (Aton Pharma)	depsipéptido (Fujisawa)
	MS-275 (Schering AG)	
Inhibidores de metaloproteinasa	Neovastat (Aeterna Laboratories)	CMT-3 (CollaGenex)
	marimastat (British Biotech)	BMS-275291 (Celltech)
Inhibidores de ribonucleósido reductasa	maltolato de galio (Titan)	tezacitabina (Aventis)
	triapina (Vion)	didox (Molecules for Health)
Agonistas/antagonistas de TNF alfa	virulizina (Lorus Therapeutics)	revimid (Celgene)
	CDC-394 (Celgene)	
Antagonista del receptor de endotelina A	atrasentán (Abbott)	YM-598 (Yamanouchi)
	ZD-4054 (AstraZeneca)	
Agonistas del ácido retinoico	fenretinida (Johnson & Johnson)	alitretinoína (Ligand)
	LGD-1550 (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)
	fluoximesterona	2-metoxiestradiol (EntreMed)
	metiltestosterona	arzoxifeno (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)	

Tabla 2	
SR-27897 (inhibidor de CCK A, Sanofi- Synthelabo)	ceflatonina (promotor de la apoptosis, ChemGenex)
tocladesina (agonista de AMP cíclico, Ribapharm)	BCX-1777 (inhibidor de PNP, BioCryst)
alvocidib (inhibidor de CDK, Aventis)	ranpirnasa (estimulante de ribonucleasa, Alfacell)
CV-247 (inhibidor de COX-2, Ivy Medical)	galarubicina (inhibidor de la síntesis de ARN, Dong-A)
P54 (inhibidor de COX-2, Phytopharm)	tirapazamina (agente reductor, SRI International)
CapCell™ (estimulante de CYP450, Bavarian Nordic)	N-acetilcisteína (agente reductor, Zambon)
GCS-100 (antagonista de gal3, GlycoGenesys)	R-flurbiprofeno (inhibidor de NF-kappaB, Encore)
Inmunógeno G17DT (inhibidor de gastrina, Aphton)	3CPA (inhibidor de NF-kappaB, Active Biotech)
efaproxiral (oxigenador, Alios Therapeutics)	seocalcitol (agonista del receptor de la vitamina D, Leo)
PI-88 (inhibidor de heparanasa, Progen)	131-I-TM-601 (antagonista de ADN, TransMolecular)
tesmilifeno (antagonista de histamina, YM Biosciences)	eflornitina (inhibidor de ODC, ILEX Oncology)
histamina (agonista del receptor de histamina H2, Maxim)	ácido minodróico (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

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

Métodos de diagnóstico

En un aspecto, la 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.

La presencia, nivel, o ausencia de un producto de ARNm, microARN, o polipéptido en una muestra de ensayo puede evaluarse mediante la obtención de una muestra de ensayo de un sujeto de ensayo y la puesta en contacto de la muestra de ensayo con un compuesto o un agente capaz de detectar el ácido nucleico (p. ej., sonda de ARN o ADN) o polipéptido. La "muestra de ensayo" incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. El nivel de expresión de un gen o genes de interés puede medirse de varias maneras, incluyendo la medición del ARN codificado por el gen.

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

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

Los métodos de la presente 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.

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

5 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

10 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

15 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.

20 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

25 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

30 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.

40 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

45 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.

50

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.

55

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.

5 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.

15 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

20 "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.

25 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.

50 "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, polibuteno, poliuretanos, Teflón, 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.

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.

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.

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.

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.

Una "muestra de ensayo" o una "muestra biológica", tal y como se usa en la presente memoria, puede significar una muestra de tejido o fluido biológico que comprende ácidos nucleicos. Dichas muestras incluyen, pero no están limitadas a, tejido o fluido corporal aislado de animales. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas para propósitos histológicos, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, orina, efusiones, fluido amniótico, fluido ascítico, pelo, y piel. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes. Una muestra biológica puede proporcionarse retirando una muestra de células de un animal, pero también puede conseguirse usando células aisladas previamente (p. ej., aisladas por otra persona, en otro momento, y/o para otro propósito), o realizando los métodos descritos en la presente memoria *in vivo*. También pueden usarse tejidos de archivo, tales como aquellos que tienen un historial de tratamiento o resultado.

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

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

"Perfil de expresión", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un perfil de expresión genómico, p. ej., un perfil de expresión de microARN. Los perfiles pueden generarse por cualquier medio conveniente para determinar un nivel de una secuencia de ácido nucleico p. ej., hibridación cuantitativa de microARN, ARNc, etc., PCR cuantitativa, ELISA para cuantificación, y semejantes, y permite el análisis de la expresión génica diferencial entre dos muestras.

Se ensaya una muestra de un sujeto o paciente, p. ej., células o una colección de las mismas, p. ej., tejidos. Las muestras se recogen por cualquier método conveniente, como se conoce en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico de interés son secuencias de ácido nucleico que se encuentra que son predictivas, incluyendo las secuencias de ácido nucleico de las descritas en la presente memoria, en las que el perfil de expresión puede incluir datos de la expresión para 5, 10, 20, 25, 50, 100 o más de, incluyendo todas las secuencias de ácido nucleico listadas. El término "perfil de expresión" también puede significar la medición de la abundancia de las secuencias de ácido nucleico en las muestras medidas.

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

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

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener partes tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de 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 (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m 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 T_m, 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 A_{ct} 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; Carrell *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 metastásicos, 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.

20 Terapia con LNA *in vivo*

Después de la inyección en la vena de la cola de 4×10^4 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.

25 Histología

Para la visualización macroscópica gruesa de los nódulos metastásicos, se tiñeron con H y E secciones de tejido pulmonar con un grosor de 5 μ 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). Brevemente, se resuspendieron 1×10^6 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 2×10^5 células a través de la vena de la cola en ratones NOD-SCID, dando lugar a nódulos metastásicos, cuya disociación posterior rindió una segunda generación de derivados metastásicos pulmonares (LM2). Para la línea celular A375, se realizó una tercera ronda de selección *in vivo*, dando lugar a los derivados A375-LM3 altamente metastásicos.

Con el fin de monitorizar las metástasis *in vivo* a través de imagenología 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 imaginería bioluminiscente no invasiva como se ha descrito previamente (Minn et al., 2005). Para determinar si la selección *in vivo* se había conseguido, se resuspendieron 4×10^4 células parentales MeWo o células MeWo-LM2 y 1×10^5 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 4×10^4 células parentales MeWo que sobreexpresan miR-199a, miR-1908, miR-214, o una horquilla control, 4×10^4 células MeWo-LM2 con expresión silenciada de miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1908, o una secuencia control, y 2×10^5 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 1×10^5 células MeWo-LM2 que expresan un ARNsh dirigido a ApoE, DNAJA4, o una secuencia control o ARNsi que inhibe LRP1 o una secuencia control en el entorno de la inhibición de miARN en ratones NOD-SCID de 6-8 semanas de edad. Para los experimentos de pretratamiento de ApoE, se incubaron células MeWo-LM2 en presencia de ApoE o BSA a 100 µg/mL a 37 °C. Después de 24 horas, se inyectaron 4×10^4 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 1×10^5 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^{-/-} de 8 semanas de edad 5×10^4 células de melanoma de ratón B16F10. Para los estudios de crecimiento tumoral primario, se mezclaron 1×10^6 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 (diámetro pequeño)² x (diámetro grande)/2.

Inhibición del miARN lentiviral e inactivación génica

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

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

GATCCGACAGTAGCCTGCACATTAGTCACTTCCTGTCAGTAACCAATG
TGCAGACTACTGTTTTTTGAATT-3'

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

GATCCGCCAGTGCTCAGACTACCCGTGCCTTCCTGTCAGGAACAGGTAG
TCTGAACACTGGGTTTTTTGAATT-3'

5 miR-Zip-1908 5'-

GATCCGCGGCGGGGAACGGCGATCGGCCCTTCCTGTCAGGACCAATCGCCGTCC
CC GCCGTTTTTTGAATT-3'

Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:

shAPOE¹:

5'CCGGGAAGGAGTTGAAGGCCTACAACCTCGAGTTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

10 shAPOE²:

5'CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGC
TTTTT3'

shDNAJA4¹:

5'CCGGGCGAGAAGTTTAAACTCATATCTCGAGATATGAGTTTAAACTTCTCGC
TTTTT3'

shDNAJA4²:

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

- 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 1×10^5 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 ARNsi

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

siLRP1¹: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP1²: 5'-GCUAUGAGUUUAAGAAGUU-3';

siLRP8¹: 5'-CGAGGACGAUGACUGCUUA-3';

siLRP8²: 5'-GAACUAUUCACGCCUCAUC-3'.

Ensayo de proliferación celular

- Para determinar los efectos de la sobreexpresión de miR-199a o miR-1908 y de la inhibición de miARN inducida por LNA combinatoria sobre la proliferación celular, se sembraron $2,5 \times 10^4$ 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 3×10^4 células de melanoma MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE (100 μ M) o BSA (100 μ M). Las células viables se contaron después de 8, 24, 48, 72, y 120 horas.

Ensayo de invasión de matrigel

- Se privaron de suero células cancerosas en medio basado en DMEM con FBS al 0,2% durante 12 horas. Se pre-equilibraron cámaras de invasión trans-well (354480, BD Biosciences, Bedford, MA) antes de empezar el ensayo por la adición de 0,5 mL de medio de privación a las cámaras superior e inferior. Después de 30 minutos, el medio de la cámara superior se retiró, y se añadieron 0,5 mL de medio que contenía 1×10^5 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 μ g/mL de anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa), 5-40 μ g/mL de anti-IgG (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN), ApoE3 humana recombinante 100 μ M (4696, Bio Vision, Mountain View, CA), y BSA 100 μ 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

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

100 μ M, y BSA 100 μ 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 1×10^5 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 μ g) de ApoE3 humana recombinante o BSA con 250 μ 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 μ 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 μ M HTS Fluoroblock en cada pocillo. Se sembraron 1×10^5 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 2×10^5 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 1×10^6 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 1×10^5 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 3×10^4 células MeWo-LM2 o células endoteliales en presencia de ApoE3 (100 μ M) o BSA (100 μ 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 10⁴ 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'-TTACTGCGGCCGCTGCGTGAAACTTGGTGAATCTT-3'
 DNAJA4_3'UTR_Dir : 5'-TAATATCTCGAGCGTGGTGCGGGGCAGCGT-3'
 DNAJA4_3'UTR_Inv : 5'-CAATTGCGGCCGCTTATCTCTCATACCAGCTCAAT-3'

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

APOE_CDS_mut: 5'-

GCCAGCGCTGGGAACTGGCAACTGGTCGCTTTTGGGATTACCT-3'

APOE_3'UTR_mut1: 5'-

CAGCGGGAGACCCTGTCCCCATACCAGCCGTCCTCCTGGGGTG-3'

APOE_3'UTR_mut2: 5'-

TCCCCGCCCCAGCCGTCCTCACAGGGTGGACCCTAGTTTAATA-3'

DNAJA4_CDS_mut1: 5'-

GGGATCGGTGGAGAAGTGCCTATTGTGCAAGGGGCGGGGGATG-3'

DNAJA4_CDS_mut2: 5'-

GTAGGGGGCGGGGAACGTGTTATCCGTGAAGAGGTGGCTAGGG-3'

DNAJA4_3'UTR_mut1: 5'-

CAGGGCCAACCTTAGTTCCTAACATTCTGTGCCCTTCAGTGGAT-3'

DNAJA4_3'UTR_mut2: 5'-

ACAGTTTGTATGGACTACTATCTTAAATTATAGCTTGTTTGGA-3'

DNAJA4_3'UTR_mut3: 5'-

TAATTATTGCTAAAGAAGTATGTTTTAGTTGGTAATGGTGTAA-3'

DNAJA4_3'UTR_mut4: 5'-

CAGCTGCACGGACCAGGTTCCATAAAAACATTGCCAGCTAGTGAG-3'

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

5 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

20 Se perfundieron animales con PBS seguido de fijación con paraformaldehído al 4% infundido mediante inyección intracardiaca y posteriormente intratraqueal. Los pulmones se seccionaron, se incubaron en paraformaldehído al 4% a 4 °C toda la noche, se incluyeron en parafina, y se cortaron en incrementos de grosor de 5 µm. Para la visualización macroscópica gruesa de nódulos metastásicos, las secciones pulmonares se tiñeron con H y E. Para el análisis del contenido endotelial en nódulos metastásicos formados por células MeWo de melanoma humano en ratones, secciones de pulmón representativas se tiñeron doblemente con anticuerpos primarios frente a MECA-32

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

15 *Ensayo de tapón de matrigel in vivo*

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

Cultivo tisular

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

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 μM 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 α/β (2148, Cell Signaling).

Análisis de la expresión de ApoE en muestras clínicas de melanoma

La obtención, procesamiento, y análisis de todas las muestras clínicas se realizaron de acuerdo estrictamente con las directrices de IRB. Las lesiones cutáneas de melanoma primario se reseccionaron previamente de pacientes en MSKCC, se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina, y se seccionaron en cortes con un grosor de 5 µm. La expresión de la proteína ApoE se evaluó por análisis doble ciego de inmunohistoquímica usando el anticuerpo D6E10 anti-ApoE (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 imagenología 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 10⁴ células MeWo, 2,5 x 10⁵ células HT-144, 2 x 10⁵ células SK-Mel-334.2, 5 x 10⁴ células B16F10, y 1 x 10⁵ 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 10⁵ 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 10⁴ 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 10⁶ 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 mm³, 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 imagenología bioluminiscente *ex vivo*. Para confirmar histológicamente el grado de colonización pulmonar del melanoma, los pulmones se fijaron entonces en PFA al 4% toda la noche, se incluyeron en parafina, se seccionaron en incrementos de 5 µm y se tiñeron para vimentina humana (VP-V684, Vector Laboratories).

Generación de células de melanoma resistentes a dacarbazina

Las células de melanoma de ratón B16F10 resistentes a dacarbazina se generaron por el cultivo continuo de las células en presencia de DTIC (D2390, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En primer lugar, las células se trataron con 500 µg/mL de DTIC durante una semana. Después de este tratamiento inicial con DTIC, se dejó que el resto de las células viables (~10%) se recuperara durante una semana, después de lo cual se añadieron 750 µg/mL de DTIC al medio celular durante 5 días. Posteriormente a este tratamiento con alta dosis, se dejó que las células se recuperaran en presencia de una dosis baja de DTIC (100 µg/mL) durante una semana. Las células se cultivaron entonces continuamente en medio celular que contenía 200 µg/mL de DTIC durante al menos un mes antes de injertar las células en ratones. Se añadió DTIC al medio fresco de las células cancerosas cada 3 días. Para los experimentos de crecimiento tumoral, se inyectaron subcutáneamente 5 x 10⁴ 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 mm³, 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 mm³. 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 10⁵ 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 mm³, 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 10⁵ 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 mm³. 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^{V600E/+}; Pten^{lox/+} / Tyr::CreER; B-Raf^{V600E/+}; Pten^{lox/lox}* se ha establecido y caracterizado previamente por Dankort et al. (2009). Brevemente, se indujo melanoma en estos ratones a las 6 semanas de edad por la inyección intraperitoneal de 4-HT (H6278, 70% de isómero, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 25 mg/kg administrado en aceite de cacahuete en tres días consecutivos. La disolución madre de 4-HT se preparó disolviéndolo en EtOH al 100% a 50 mg/mL calentando a 45 °C durante 5 min y mezclando. Una vez disuelto, la disolución madre de 4-HT se diluyó entonces 10 veces en aceite de cacahuete, rindiendo una disolución de trabajo de 5 mg/mL de 4-HT que se inyectó entonces en los ratones. Después de la primera inyección de 4-HT, los ratones se asignaron de forma ciega para recibir bien una dieta control o una dieta suplementada con GW3965 (100 mg/kg). Los ratones se examinaron tres veces a la semana para detectar la presencia y progresión de lesiones de melanoma. En el día 35, se recogieron muestras de piel dorsal de los ratones tratados control y tratados con GW3965, se fijaron en PFA al 4% y se fotografiaron a 10X. El porcentaje del área de lesión de melanoma pigmentada respecto al área de piel total se cuantificó usando ImageJ. Para los análisis de supervivencia, los ratones se monitorizaron diariamente para detectar la progresión de melanoma y se sometieron a eutanasia según una puntuación estándar de condición corporal, teniendo en cuenta los signos iniciales de estado moribundo y malestar asociados con la progresión de la carga de melanoma. Después de la muerte, se recogieron y se examinaron los pulmones, cerebros, y glándulas salivares para determinar la presencia de lesiones de melanoma macroscópicas.

Genotipado de los ratones

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

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

- 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^{-/-}*:

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 *LXRα*^{-/-}:

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

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

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

5 Ratones *LXRβ*^{-/-}:

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

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

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

Ensayo de proliferación y viabilidad celular:

- 10 Para determinar los efectos de GW3965, T0901317, y Bexaroteno en el crecimiento celular *in vitro*, se sembraron 2,5 x 10⁴ células de melanoma en triplicado en placas de 6 pocillos y se cultivaron en presencia de DMSO, GW3965, T0901317, o Bexaroteno a 1 μM cada uno. Después de 5 días, se contó el número de células viables y muertas usando la tinción de azul de tripán (72-57-1, Sigma- Aldrich), que marca selectivamente las células muertas.

Ensayo de invasión celular

- 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 μM durante 56 horas, después de lo cual las células de melanoma se cambiaron a medio de privación (FBS al 0,2%) durante 16 horas en presencia de cada fármaco. Después de la privación, las células se sembraron en insertos trans-well recubiertos con matrigel, y
- 20 se dejó proceder el ensayo de invasión durante 24 horas a 37 °C. Para los experimentos con anticuerpos neutralizantes de ApoE, se añadieron 40 μg/mL de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40 μg/mL de anticuerpo anti-IgG control (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN) a cada inserto trans-well al inicio del ensayo.

Ensayo de reclutamiento endotelial

- 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 μM durante 56 horas, después de lo cual se sembraron 5 x 10⁴ 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 10⁵ células HUVEC en un
- 30 inserto de migración trans-well de 3,0 μm HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon, San José, CA) ajustado en cada pocillo que contenía células cancerosas en la parte inferior. Se dejó que las células HUVEC migraran hacia las células cancerosas durante 20 horas a 37 °C, después de lo cual los insertos se procesaron como se ha descrito previamente (Pencheva et al., 2012). Para los experimentos de neutralización con anticuerpo de ApoE, se añadieron 40 μg/mL de anticuerpo bloqueante anti-ApoE 1D7 (Heart Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canadá) o 40 μg/mL de anticuerpo
- 35 anti-IgG control (AB-108-C, R&D Systems, Minneapolis, MN) a cada inserto trans-well al inicio del ensayo.

Inactivación génica basada en ARNsh lentiviral

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

Se usaron las siguientes secuencias de ARNsh:

Humana:

sh₁LXR α : 5'-

CCGGCCGACTGATGTTCCACGGATCTCGAGATCCGTGGGAACATCAGTCGGT
TTTT-3'

sh₂LXR α : 5'-

CCGGGCAACTCAATGATGCCGAGTTCTCGAGAACTCGGCATCATTGAGTTGCT
TTTT-3'

sh₁LXR β : 5'-

CCGGAGAGTGTATCACCTTCTTGAAGTCTCGAGTTCAAGAAGGTGATACACTCTT
TTTT-3'

sh₂LXR β : 5'-

CCGGGAAGGCATCCACTATCGAGATCTCGAGATCTCGATAGTGGATGCCTTCT
TTTT-3'

shApoE: 5'-

CCGGGCAGACACTGTCTGAGCAGGTCTCGAGACCTGCTCAGACAGTGTCTGCT
TTTT-3'

Ratón:

sh_mLXR α : 5'-

CCGGGCAACTCAATGATGCTGAGTTCTCGAGAACTCAGCATCATTGAGTTGCT
TTTT-3'

sh_mLXR β : 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'

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

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

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

*LXRβ*_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 *LXRα* Directo: 5'-GCGCTCAGCTCTTGCTACT-3'

LXRα Inverso: 5'-CTCCAGCCACAAGGACATCT-3'

LXRβ Directo: 5'-GCTCTGCCTACATCGTGGTC-3'

LXRβ Inverso: 5'-CTCATGGCCCAGCATCTT-3'

ABCA1 Directo: 5'-ATGGAGCAGGGAAGACCAC-3'

20 *ABCA1* Inverso: 5'-GTAGGCCCGTGCCAGAAGTT-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 x 10⁴ células MeWo en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se cotransfectaron 100 ng de la construcción pGL3-ME.1/ME.2-promotor de *ApoE* y 2 ng de la construcción pRL-CMV luciferasa de renilla (E2261, Promega) en células en presencia de DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μM, cada condición en cuadruplicado. Para evaluar la activación transcripcional por LXRα o LXRβ, se sembraron 5 x 10⁴ células MeWo que expresan un ARNsh control o ARNsh dirigido a LXRα o LXRβ en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se cotransfectaron 200 ng de la construcción pGL3-ME.1/ME.2-promotor de *ApoE* y 2 ng de pRL-CMV luciferasa de renilla en células en presencia de DMSO, GW3965, o T0901317 a 1 μM, cada condición en cuadruplicado. Después de 24 horas, las células se lisaron, y el lisado celular se analizó para determinar la actividad de luciferasa de luciérnaga y de renilla usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual (E1960, Promega) y un Lector de Microplacas Bio-Tek Synergy NEO. La señal de luciferasa de luciérnaga se normalizó respecto a la señal de luciferasa de renilla y todos los datos se expresan respecto a la relación de la actividad de luciferasa medida en las células control tratadas con DMSO.

Se usaron los siguientes cebadores de clonación:

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

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 H₂O₂ 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.

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

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

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

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

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

Para determinar si ApoE y DNAJA4 también regulan el reclutamiento endotelial metastásico dependiente de miARN *in vivo*, se realizó la 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 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 imagenología bioluminiscente en metástasis pulmonares por 5×10^4 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: hidrocloreto del ácido 3-[3-[N-(2-Cloro-3-trifluorometilbencil)-(2,2-difeniletil)amino]propilo]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 4×10^4 células MeWo parentales

en los ratones (Figura 10E). La administración oral de GW3965 a los ratones de esta manera dio lugar a una reducción significativa de las metástasis de melanoma *in vivo* (Figura 10E).

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

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

La complejidad del cáncer requiere la aplicación de análisis sistemáticos (Pe'er y 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 β como una nueva diana terapéutica en melanoma

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

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

El tratamiento de células de melanoma con dos agonistas de LXR estructuralmente distintos, GW3965 **2** o T0901317 **1**, o el agonista de RXR bexaroteno no afectó las tasas de proliferación celular o viabilidad celular (Figura 20 B-C). A continuación, evaluamos los efectos de la activación de LXR o RXR en la invasión celular y el reclutamiento endotelial - fenotipos presentados por poblaciones de melanoma metastásico y cáncer de mama metastásico (Pencheva et al., 2012; Png et al., 2012). El tratamiento de las líneas de melanoma humano mutacionalmente diversas MeWo (*B-Raf/N-Ras* tipo salvaje), HT-144 (*B-Raf* mutante), y SK-Mel-2 (*N-Ras* mutante), así como la línea de melanoma humano primario SK-Mel-334.2 (*B-Raf* mutante) con GW3965 **2** o T0901317 **1** suprimió de forma consistente la capacidad de las células de melanoma de invadir a través de matrigel y de reclutar células endoteliales en ensayos trans-well (Figura 19B-C). En comparación, el tratamiento con bexaroteno suprimió la invasión en solo la mitad de las líneas de melanoma ensayadas y no afectó significativamente el fenotipo de reclutamiento endotelial (Figuras 19B-C).

Dada la superioridad del agonismo de LXR sobre RXR en la inhibición amplia tanto de la invasión celular como del reclutamiento endotelial en múltiples líneas de melanoma, investigamos el requerimiento de la señalización de LXR en la mediación de los efectos supresores de los agonistas de LXR. La inactivación de LXR β de melanoma, pero no de LXR α , 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 β 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 β 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 mm³, 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 mm³) (Figura 21A-E), investigamos a continuación si la terapia de activación de LXR podía inhibir el crecimiento de tumores grandes (~150 mm³).

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

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

La cooperatividad entre la activación de *B-Raf* y la pérdida de *Pten* en la dirección de la progresión del melanoma puede aumentarse más por la inactivación de *CDKN2A*, un regulador del ciclo celular mutado frecuentemente en melanomas familiares (Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994). Examinamos así el efecto de la activación de LXR en los melanomas *B-Raf*^{V600E/+}; *Pten*^{-/-}; *CDKN2A*^{-/-}, lo que nos permitió ensayar la eficacia terapéutica del agonismo de LXR en un modelo de progresión de melanoma dirigido genéticamente más agresivo. De forma importante, la administración terapéutica de GW3965 **2** inhibió de forma robusta el crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar por células de melanoma primario de ratón *B-Raf*^{V600E/+}; *Pten*^{-/-}; *CDKN2A*^{-/-}, inyectadas en ratones singénicos inmunocompetentes y prolongó la supervivencia global de ratones que portaban la carga de melanoma *B-Raf*^{V600E/+}; *Pten*^{-/-}; *CDKN2A*^{-/-} (Figura 24D-F). Tomados conjuntamente, la supresión robusta de la progresión del melanoma en modelos de melanoma en ratones inmunocompetentes independientes de xenoinjertos e inducidos genéticamente que presentan los diversos perfiles mutaciones de los melanomas humanos motiva el ensayo clínico de la terapia de activación de LXR.

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

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

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

A la vista de la función supresora de metástasis de ApoE reportada previamente en melanoma (Pencheva et al., 2012), investigamos si la activación de LXR β 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 β a ApoE en células de melanoma, la neutralización de ApoE extracelular con un anticuerpo bloqueó completamente la supresión mediada por LXR β 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 β , pero no de LXR α , 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 β , 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 β

La supresión inducida por LXR β 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 β 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 β .

Consistente con nuestros descubrimientos en células de melanoma humano, la inactivación de LXR β 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 β 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 α o LXR β . De forma interesante, la ablación genética de LXR β sistémica bloqueó la capacidad de GW3965 de suprimir el crecimiento tumoral del melanoma, mientras la inactivación de LXR α 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 β que para LXR α , se suprimió en ratones LXR β $-/-$, pero no en ratones LXR α $-/-$ (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 β sistémica. De acuerdo con esto, encontramos que LXR β 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 β 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 β 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 β en la supresión de metástasis. Concluimos así que los efectos de la activación de LXR β en el crecimiento tumoral primario están incitados principalmente a través de la inducción de *ApoE* sistémica, mientras los efectos del agonismo de LXR β en la metástasis están mediados a través de la inducción transcripcional de *ApoE* tanto en células de melanoma como en tejidos sistémicos.

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

Encontramos que los pacientes cuyos melanomas habían metastatizado presentaban una expresión de ApoE aproximadamente 3 veces menor en sus tumores primarios respecto a los pacientes cuyos melanomas no habían metastatizado (Figura 30H, $P = 0,002$). De forma importante, los niveles de expresión de ApoE en las lesiones de melanoma primario de los pacientes estratificó de forma robusta a los pacientes en alto riesgo respecto a los que presentaban bajo riesgo de recidiva metastásica (Figura 30I, $P = 0.002$). Estas observaciones son consistentes con descubrimientos previos que revelaron niveles significativamente menores de ApoE en metástasis de melanoma distantes respecto a las lesiones primarias (Pencheva et al., 2012). Colectivamente, este trabajo indica que *ApoE*, como un único gen, podría actuar probablemente como un biomarcador de pronóstico y predictivo en melanomas primarios para identificar a pacientes que i.) están en riesgo de recidiva metastásica de melanoma y como tal ii.) podrían obtener un beneficio clínico de la inducción de *ApoE* mediada por un agonista de LXR β .

Ejemplo 19 La terapia de activación de LXR β suprime el crecimiento de melanomas resistentes a dacarbazina y vemurafenib

Animados por la capacidad robusta de la terapia de activación de LXR β 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 β .

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.

Aunque la dacarbazina suprimió significativamente el crecimiento de la línea parental sensible a DTIC (Figura 31B), no afectó el crecimiento tumoral por las células B16F10 resistentes a DTIC (Figura 31C). GW3965 **2** suprimió de forma robusta el crecimiento tumoral por el clon de melanoma B16F10 resistente a DTIC más del 70% (Figuras 31C-D). De forma importante, la administración oral de GW3965 **2** también inhibió fuertemente el crecimiento de tumores de melanoma humano resistentes a DTIC derivados *in vivo* formados por la línea celular MeWo independiente (Figura 31E-F y Figura 32A).

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

Ensayamos el impacto de la terapia de activación de LXR β 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 β es una nueva estrategia terapéutica que suprime de forma robusta el crecimiento tumoral y la metástasis de melanoma a través de la inducción transcripcional de *ApoE* - un supresor clave de la invasión y angiogénesis metastásica del melanoma (Pencheva et al., 2012; Figura 31I).

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

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

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

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

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

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

Para determinar el efecto de los varios agonistas de LXR (LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, y SB742881 en la expresión de ApoE en las células de melanoma, se sembraron 1×10^5 células de melanoma humano MeWo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se añadió DMSO o el agonista de LXR respectivo al medio celular a una concentración de 500 nM, 1 µM, o 2 µM, como se indica, y las células se incubaron en presencia de DMSO o el fármaco durante 48 horas a 37 °C. La cantidad total de DMSO añadida al medio celular se mantuvo por debajo del 0,2%. Se extrajo ARN de lisados celulares completos usando el kit de Purificación de ARN Total (17200, Norgen). Para cada muestra, se transcribieron de forma inversa 600 ng de ARN en ADNc usando el kit de Síntesis de la Primera Cadena de ADNc (Invitrogen). Se mezclaron aproximadamente, 200 ng de ADNc con Mezcla Maestra SYBR® verde de PCR y los cebadores directos e inversos correspondientes específicos para la detección de ApoE humana. Cada reacción se llevó a cabo en cuadruplicado, y los niveles de expresión del ARNm de ApoE se midieron por amplificación con PCR cuantitativa en tiempo real usando un Sistema de PCR en Tiempo Real ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). La expresión relativa de ApoE se determinó usando el método $\Delta\Delta C_t$. 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 (5×10^4 células de cáncer renal humano RCC, 5×10^4 células de cáncer pancreático humano PANC1, y 5×10^4 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 1×10^5 células/mL de medio de privación, y se sembraron 0,5 mL de suspensión celular, que contenía 5×10^4 células en cada trans-well. El ensayo de invasión se dejó proceder durante 24 horas a 37 °C. Después de la compleción del ensayo, los insertos se lavaron en PBS, las células que no invadieron se rasparon suavemente del lado superior de cada inserto usando puntas q, y las células que invadieron en el lado basal del inserto se fijaron en PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los insertos se lavaron en PBS y se cortaron entonces y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje VectaShield que contenía la tinción nuclear DAPI (H-1000, Vector Laboratories). Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

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

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

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

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

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

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

Hemos demostrado la capacidad de varios agonistas de LXR para inducir la expresión de ApoE con potencia variada en células de melanoma (Figura 34). Como el efecto terapéutico de los agonistas de LXR sobre el cáncer es a través de la activación de la expresión de ApoE, establecimos la hipótesis de que la potencia terapéutica de cualquier agonista de LXR dado está correlacionada directamente con su capacidad de inducir la expresión de ApoE. Para confirmar esto, cuantificamos el efecto del tratamiento con varios agonistas de LXR en el reclutamiento endotelial y la invasión de células tumorales de células de melanoma *in vitro*. Como se muestra en la Figura 37, el grado en el cual los agonistas de LXR inhiben los fenotipos de progresión del cáncer *in vitro* está relacionado con la potencia de inducción de ApoE del agonista de LXR.

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

Reclutamiento endotelial: se trataron células de melanoma humano MeWo con DMSO, LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 a 1 µM cada uno durante 56 horas. Posteriormente, se sembraron $5 \times$

10⁴ 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 10⁵ células HUVEC en un inserto de 3,0 µm HTS Fluoroblock (351151, BD Falcon) ajustado en cada pocillo que contenía las células cancerosas en la parte inferior. Se dejó que las células HUVEC migraran hacia las células cancerosas durante 20 horas, después de lo cual los insertos se lavaron en PBS, se fijaron en PFA al 4%, se marcaron con DAPI, y se montaron en portaobjetos. Se formaron imágenes del lado basal de cada inserto usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) a un aumento 5X, y se cuantificó el número de células positivas para DAPI usando ImageJ.

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

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

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

Para evaluar el efecto de LXR-623, WO-2007-002563 Ej. 19, WO-2010-0138598 Ej. 9, o SB742881 administrados oralmente en el crecimiento tumoral del melanoma, se resuspendieron 5 x 10⁴ 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 palpaban diariamente para detectar la formación de tumores y después de la detección de tumores con un volumen de 5-10 m³, los ratones se asignaron a un pienso control o un pienso que contenía cada agonista de LXR respectivo: LXR-623 (20 mg/kg/día), WO-2007-002563 Ej. 19 (100 mg/kg/día), WO-2010-0138598 Ej. 9 (10 mg/kg/día o 100 mg/kg/día), o SB742881 (100 mg/kg/día). Los compuestos farmacéuticos de LXR se formularon en el pienso de los ratones por Research Diets, Inc. Las dimensiones tumorales se midieron usando calibradores digitales, y el volumen tumoral se calculó como (diámetro pequeño)² x (diámetro grande)/2.

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

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

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

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

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

La estrategia basada en la selección *in vivo* no sesgada descrita anteriormente dio lugar al descubrimiento de miARN 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 (Peng 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 enfrente 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 ggcactgggt cgcttttggg 240
 attacctgcg ctgggtgcag acaactgtctg agcagggtgca ggaggagctg ctgagctccc 300
 aggtcaccca ggaactgagg gcgctgatgg acgagaccat gaaggagttg aaggcctaca 360
 aatcggaact ggaggaacaa ctgaccccgg tggcggagga gacgcgggca cggctgtcca 420
 aggagctgca ggcggcgag gcccggctgg gcgcggacat ggaggacgtg tgcggccgcc 480
 tgggtgcagta ccgcggcgag gtgcaggcca tgctcggcca gagcaccgag gagctgcggg 540
 tgcgcctcgc ctcccacctg cgcaagctgc gtaagcggct cctccgcgat gccgatgacc 600
 tgcagaagcg cctggcagtg taccaggccg gggcccgcga gggcgccgag cgcggcctca 660
 gcgccatccg cgagcgctg gggcccctgg tggaacaggg ccgcgtgcgg gccgccactg 720
 tgggctccct ggccggccag ccgctacagg agcggggcca ggcctggggc gagcggctgc 780
 gcgcgcggat ggaggagatg ggcagccgga cccgcgaccg cctggacgag gtgaaggagc 840
 aggtggcgga ggtgcgcgcc aagctggagg agcaggccca gcagatacgc ctgcaggccg 900
 aggccttcca ggcccgcctc aagagctggt tcgagcccct ggtggaagac atgcagcgcc 960
 agtgggccgg gctgggtggag aaggtgcagg ctgccgtggg caccagcgcc gccctgtgc 1020
 ccagcgacaa tcaactgaac ccgaagcctg cagccatgcg accccacgcc accccgtgcc 1080

ES 2 765 573 T3

```

tcctgcctcc ggcgcagcctg cagcgggaga ccctgtcccc gccccagccg tcctcctggg      1140
gtggacccta gtttaataaa gattcaccaa gtttcacgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1200
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                           1223

```

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

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val

```

195	200	205
Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg		
210	215	220
Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly		
225	230	235
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 cacggaagg caagggggag gccucggggc ggcgggacag      120
uugucggagg gcgcccucca ggcccaagcc gccuucuccg gcccccgcca uggcccgggg      180
cggcagucag agcuggagcu ccggggaauc agacgggcag ccaaaggagc agacgcccga      240
gaagcccaga cacaagaugg ugaaggagac ccaguacuau gacauccugg gcgugaagcc      300
cagcgcgucc ccggaggaga ucaagaaggc cuaucggaag cuggcgcuca aguaccaccc      360
ggacaagaac ccggaugagg gcgagaaguu uaaacucaua ucccaggcau augaagugcu      420
uucagaucca aagaaaaggg auguuuuga ccaaggcgga gagcaggcaa uuaaagaagg      480
aggcucaggc agccccagcu ucucuucacc cauggacauc uuugacaugu ucuuuggugg      540
ugguggacgg auggcuagag agagaaggg caagaauguu guacaccagu uaucuguaac      600
ucuugaagau cuauauaau gagucacgaa gaaauuggcc cuccagaaaa augaauuuu      660
ugagaaaugu gaagguguug gugggaagaa ggaucggug gagaagugcc cgcugugcaa      720
ggggcggggg augcagauc acauccagca gaucggggccg ggcaugguac agcagaucca      780

```

gaccgugugc	aucgagugca	agggccaggg	ugagcgcauc	aacccaag	accgcugcga	840
gagcugcagc	ggggccaagg	ugaucguga	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	acaaucgaa	ucuuguuuu	acauccaaag	caggugaggu	1140
gauaaagcac	ggggaccuga	gaugcgugcg	cgaugaagga	augcccaucu	acaaagcacc	1200
ccuggaaaaa	gggauucuga	ucauacaguu	uuuaguaauc	uuuccugaaa	aacacuggcu	1260
uucucuggaa	aagcuuccuc	agcuggaagc	uuuacucccu	ccucgacaga	aagugaggau	1320
uacagaugac	auggaucagg	uggagcugaa	ggaguuuugu	cccaaugagc	agaacuggcg	1380
ucagcacagg	gaggccuacg	aggaggacga	agacgggccc	caggcuggag	ugcagugcca	1440
gacggcauga	cguggugcg	ggcagcgugg	ccccaccgga	cuagcacaug	augaauugaa	1500
aguuggcaca	augaaauga	caucgcuua	augggcuugu	guuugggaug	uccugugua	1560
guguucagca	uucuaauug	cugagugucu	uuuuggcuuu	ucuuuugguu	guaacuuuag	1620
uuauagcuua	uuuuauuuu	aaauguuua	aguauaaauc	accucuaguc	ugcauauugga	1680
aucuguucau	uucuaauuuc	aggauauacu	uuugagaugu	cagugauugc	accaauacuu	1740
ugugcuucua	guggcuuugc	cauaauucag	ugucaccaau	aaggcacagc	ccaguuaagca	1800
gcuuagcccc	ccuagcaaac	ccaaggcac	aaagugggca	uccugacuca	ucucuagguc	1860
ugugguuucu	ccccucuucc	cuuggcagag	uuauugaggg	caugaucuca	gggcugcuua	1920
gauaacauuu	cugaggauuc	uagaugaucc	ucuuaaagaa	uaaaagcaca	uccguggauc	1980
ggacauggcu	gcaugugccu	gcuaaacagg	gccaacuua	uuccuacugu	ucugugcccu	2040
ucaguggaug	gaacgugagu	gucugaucau	cucucuugga	aguuuucuga	accuuccaag	2100
cucuguggug	aggacaaacc	aguguuugaa	ucauauugc	auaacuguuu	gccugugacc	2160
cucacaccuu	guucuucagg	guuuuaauga	uuuucuguug	acaacuuuug	caaugcuuuc	2220
ccaccaaagu	gcuuacuugu	aaagaaaacu	aaauccuucu	guguccccgg	cagccucagu	2280
gcagcaacag	aagccaaggg	agaugcugc	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	ggauauuagu	2580
cauuauuuua	uucaugacag	guagacuaca	auucgaacu	aggguuaccu	cagucuuuag	2640
ccauuacugc	uuauuucuuu	uccccaaguc	acaaaaacu	uguaagcugc	uggguuaaag	2700

cagaggccac cugucagauc uacccuaccc uuauuugguu acauggcacc ugagaguuuc 2760
 acucagacca gggauucuucc uuaggaggggu caaagugcag aucagaccac gacagguaagg 2820
 ugaaccagcu gcacggacca gguucccgca aaacauugcc agcuagugag gcauaauuug 2880
 cucaaaguau agaaacagcc caccugugcc cacuuugacc auuggugagg auagauauaa 2940
 aaucacuucu uccaacgaag ccuaggugaa aaucuauua uaaauggacc acaacucugg 3000
 ggugucguuu uugugcugug acuuccuaau uauugcuaaa gaacuacugu uuaguuggua 3060
 augguguaaa auuacauuca gcuccuucuu gucauauaaa aggaauuugg agggugucgc 3120
 uuaaaauuuu auuccaccug uacauuuguc acuuuauuuu uaaaauugag cugguauagag 3180
 agauaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3203

<210> 4
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 ggcgcgggccg ggggcgcggg ccagggugcc 60
ggcagggggcg uccggggcg ucugaccggc cucgcccgcg ccccccgcag acacaagaug 120
gugaaggaga cccaguacua ugacauccug ggcgugaagc ccagcgcguc cccggaggag 180
aucaagaagg ccuauccgaa gcuggcgcuc aaguaccacc cggacaagaa cccggaugag 240
ggcgagaagu uuaaacucau aucccaggca uaugaagugc uuucagauc aaagaaaagg 300
gauguuuau accaaggcg agagcaggca auuaaagaag gaggcucagg cagccccagc 360
uucucuucac ccauggacau cuuugacaug uucuuuggug gugguggacg gauggcuaga 420
gagagaagag gcaagaauu uguacaccag uuauuguaa cucuugaaga ucuauauau 480
ggagucacga agaaaauugc ccuccagaaa aauguaauu gugagaaug ugaagguguu 540
ggugggaaga agggauccgu ggagaagugc ccgcugugca aggggcgggg gaugcagauc 600
cacauccagc agaucgggccc gggcauggua cagcagauc agaccgugug caucgagugc 660
aagggccagg gugagcgcau caaccccaag gaccgcugcg agagcugcag cggggccaag 720
gugaucgug agaagaagau uaucgaggua cauguugaaa aagguaugaa agaugggcaa 780
aagauacuau ucauggaga aggagauag gagccugagc uggagccugg ugaugucuaa 840
auugugcuug aucagaagga ucauaguguc uuucagagac gagggcauga cuugaucaug 900
aaaauaaaa uucagcuuuc ugaagcucu uguggcuuca agaagacgau aaaaacauug 960
gacaaucgaa uucuuuguau uacauccaaa gcaggugagg ugauaaagca cggggaccug 1020
agaugcgugc gcgaugaagg aaugcccauc uacaaagcac ccugggaaaa agggauucug 1080
aucuacagu uuuuaguaau cuuuccugaa aaacacuggc uuucucugga aaagcuuccu 1140
cagcuggaag cuuacucucc uccucgacag aaagugagga uuacagauga cauggaucag 1200
guggagcuga aggaguuuug ucccaaugag cagaacuggc gucagcacag ggaggccuac 1260
gaggaggacg aagacgggccc ccaggcugga gugcagugcc agacggcag acguggugcg 1320
gggcagcgug gccccaccgg acuagcacau gaugaaugua aaguuggcac aaugaaaug 1380
acauccguu aauggccuug uguuugggau guccugugua uguguucagc auucuaauu 1440

gcugaguguc	uuuuuggcuu	uucuuuuggu	uguaacuuaa	guuauagcuu	aaauuauuu	1500
uaaauguuuu	aaguauaaa	caccucuagu	cugcauauug	aaucuguuca	uuucuauuuu	1560
caggauauac	uuuuagagug	ucagugauug	caccaauacu	uugugcuucu	aguggcuuug	1620
ccauaaauca	gugucaccaa	uaaggcacag	cccaguuagc	agcuuagccc	cccuagcaaa	1680
ccccaaaggca	caaagugggc	auccugacuc	aucucuaggu	cugugguuuc	uccccucuuu	1740
ccuuggcaga	guuauugagg	gcaugaucuc	agggcugcua	agauaacauu	ucugaggauu	1800
cuagaugauc	cucuuaaaga	auaaaagcac	auccguggau	cggaacauug	ugcaugugcc	1860
ugcuuaacag	ggccaacuua	guuccuacug	uucugugccc	uucaguggau	ggaacgugag	1920
ugucugauca	ucucucuuug	aaguuuucug	aaccuuccaa	gcucuguggu	gaggacaaac	1980
caguguuuga	aucauauugu	gauaacuguu	ugccugugac	ccucacaccu	uguucuuacag	2040
gguuuuuaug	auuuucuguu	gacaacuuuu	gcaaugcuuu	cccaccaaag	ugcuuacuug	2100
uaaagaaaac	uaaauccuuc	uguguccccg	gcagccucag	ugcagcaaca	gaagccaagg	2160
gagaauugcug	cugguuuugc	ccauggcaca	gccagcuucu	cugaccagua	auccggggug	2220
acuugaggggu	cugcaaaggc	auagaacucc	ccaguguuuu	ccaccucauu	cucccagauu	2280
gagcuccccuu	ccaaagggauc	guuccucuca	uugcacagcc	auauuacaaa	ggguuuuccug	2340
cucaagugau	guuuugguua	gaacuucgcu	gaguuccacu	guggauuaca	guuuguauug	2400
acuacuacug	uaaaauauag	cuuguuuugga	gggauauuag	ucauuauuuu	auucaugaca	2460
gguagacuac	aaauucgaacu	uagggguuacc	ucagucuuua	gccauuacug	cuuauuuucu	2520
uucccccaagu	cacaaaaaac	uuguaagcug	cuggguuuaa	gcagaggcca	ccugucagau	2580
cuaccuccuac	cuuauuuuggu	uacauggcac	cugagaguuu	cacucagacc	agggauucuuc	2640
cuuaggagggg	ucaaagugca	gaucagacca	ugcagguaag	gugaaccagc	ugcacggacc	2700
agguuccccgc	aaaacauugc	cagcuaguga	ggcauaauuu	gcucaaagua	uagaaacagc	2760
ccaccugugc	ccacuuugac	cauugggugag	gauagauaua	aaauacacuuc	uuccaacgaa	2820
gccuagguga	aaaucuauuu	auaaauggac	cacaacucug	gggugucguu	uuugugcugu	2880
gacuuccuua	uuauugcuua	agaacuacug	uuuaguuggu	aaugguguaa	aaauacauuc	2940
agcuccuucu	ugucauauaa	aaggaaauug	gagggugucg	cuuaaaauuu	uaauccaccu	3000
guacauuugu	cacuuuuaaa	uuaaaaauuga	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 aacucauau ccaggcauau gaagugcuuu cagauccaaa 120
 gaaaagggau guuuugacc aaggcggaga gcaggcauu aaagaaggag gcucaggcag 180
 cccagcuuc ucuucacca uggacaucuu ugacauguuc uuugguggug guggacggau 240
 ggcuagagag agaagaggca agaanguugu acaccaguua ucuguaacuc uugaagauuc 300
 auauaaugga gucacgaaga aaugggccc ccagaaaaau guauuuugug agaaauguga 360
 agguguuggu gggaagaagg gaucggugga gaagugcccg cugugcaagg ggcgggggau 420
 gcagauccac auccagcaga ucgggcccgg caugguacag cagauccaga ccgugugcau 480
 cgagugcaag ggccagggug agcgcaucaa cccaaggac cgugcgaga gcugcagcgg 540
 ggccaaggug auccgugaga agaagauuau cgagguacau guugaaaaag guaugaaaga 600

ugggcaaaaag	auacuauuuc	auggagaag	agaucaggag	ccugagcugg	agccugguga	660
ugucauaauu	gugcuugauc	agaaggauca	uagugucuuu	cagagacgag	gccaugacuu	720
gaucaugaaa	augaaaauuc	agcuuucuga	agcucuuugu	ggcuucaaga	agacgauaaa	780
aacauuggac	aaucgaauuc	uuguuauuac	auccaaagca	ggugagguga	uaaagcacgg	840
ggaccugaga	ugcgugcgcg	augaaggaau	gcccaucuauc	aaagcacccc	uggaaaaagg	900
gauucugauc	auacaguuuu	uaguaaucuu	uccugaaaaa	cacuggcuuu	cucuggaaaa	960
gcuuccucag	cuggaagcuu	uacucccucc	ucgacagaaa	gugaggauua	cagaugacau	1020
ggaucaggug	gagcugaagg	aguuuugucc	caaugagcag	aacuggcguc	agcacaggga	1080
ggccuacgag	gaggacgaag	acggggcccca	ggcuggagug	cagugccaga	cggcaugacg	1140
uggugcgggg	cagcgugggc	ccaccggacu	agcacaugau	gaanguaaaag	uuggcacaau	1200
gaaaaugaca	ucgcuuuuau	ggccuugugu	uugggauguc	cuguguaugu	guucagcauu	1260
cuuaauugcu	gagugucuuu	uuggcuuuuc	uuuugguugu	aacuuuaguu	auagcuuaau	1320
uuauauuuua	auguuuuuag	uauaaaucac	cucuagucug	cauauuggaau	cuguucauuu	1380
cuauuuucag	gauauacuuu	ugagauguca	gugauugcac	caauacuuug	ugcuucuaugu	1440
ggcuuugcca	uaauucagug	ucaccaauaa	ggcacagccc	aguuagcagc	uuagccccc	1500
uagcaaaccc	caaggcacaa	agugggcauc	cugacucauc	ucuaaggucug	ugguuucucc	1560
ccucuucccu	uggcagaguu	auugagggca	ugaucucagg	gcugcuaaga	uaacauuucu	1620
gaggauucua	gaugauccuc	uuaaagaaua	aaagcacauc	cguggaucgg	acauggcugc	1680
augugccugc	uuacagggc	caacuuaugu	ccuacuguuu	ugugcccuuc	aguggaugga	1740
acgugagugu	cugaucaucu	cucuuggaag	uuuucugaac	cuuccaagcu	cuguggugag	1800
gacaaaccag	uguuugaauu	auaugcugau	aacuguuugc	cugugacccu	cacaccuugu	1860
ucuuacaggu	uuuaaugauu	uucuguugac	aacuuuugca	augcuuuccc	accaaagugc	1920
uuacuuguaa	agaaaacuaa	auccuucugu	gucccccggca	gccucagugc	agcaacagaa	1980
gccaaaggag	aaugcugcug	guuuggccca	uggcacagcc	agcuucucug	accaguaauc	2040
cggggugacu	ugagggucug	caaaggcaua	gaacucccca	guguuuuucca	ccucauucuc	2100
ccagauugag	cucccuucca	aaggauucgu	ccucucauug	cacagccaau	uuacaaagg	2160
uuuccugcuc	aagugauguu	uugguaagaa	cuucgcugag	uuccacugug	gauuacaguu	2220
uguauggacu	acuacuguaa	auuauagcuu	guuuggaggg	auauuaguca	uuauuuuauu	2280
caugacaggu	agacuacaau	ucgaacuuag	gguuaccuca	gucuuuagcc	auuacugcuu	2340
auuucuuuuc	cccaagucac	aaaaaacuug	uaagcugcug	gguuuagca	gaggccaccu	2400
gucagaucua	cccuacccuu	auuugguuac	auggcaccug	agaguuuucac	ucagaccagg	2460

ES 2 765 573 T3

```

gaucuuccuu aggagggguca aagugcagau cagaccaugc agguaaggug aaccagcugc 2520
acggaccagg uucccgcaaa acauugccag cuagugaggc auauuuugcu caaaguauag 2580
aaacagccca ccugugccca cuuugaccan uggugaggau agauauaaaa ucacuucuu 2640
caacgaagcc uaggugaaaa ucuauuuaua aauggaccac aacucugggg ugucguuuuu 2700
gugcugugac uuccuaauua uugcuaaaga acuacuguuu aguugguaau gguguaaaau 2760
uacauucagc uccuucuugu cauauaaaag gaauuuggag ggugucgcuu aaaaauuuau 2820
uccaccugua cauugugac uuuaaaauua aaauugagcu gguaugagag auaaaaaaaa 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

cagcggugcg	agcuccaggc	ccaugcacug	aggaggcgga	aacaagggga	gccccagag	60
cuccaucaag	ccccuccaa	aggcucccu	acccggucca	cgccccccac	ccccuccc	120
cgccuccucc	caauugugca	uuuuugcagc	cggaggcggc	uccgagauug	ggcugugagc	180
uucgcccggg	gagggggaaa	gagcagcgag	gagugaagcg	gggggggugg	gugaaggguu	240
uggauuucgg	ggcagggggc	gcacccccgu	cagcaggccc	uccccaaggg	gcucggaacu	300
cuaccucuuc	accacgccc	cuggugcgcu	uugccgaagg	aaagaauaag	aacagagaag	360
gaggaggggg	aaaggaggaa	aagggggacc	ccccaacugg	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	gaggccccug	agauuugucc	660
acagaguaag	gcccagcgau	gccagccaaa	cgagcauaac	ugccugggua	cugagcugug	720
uguuuccaug	ucccgccucu	gcaauggggu	ccaggacugc	auggacggcu	cagaugaggg	780
gccccacugc	cgagagcucc	aaggcaacug	cucucgcccug	ggcugccagc	accauugugu	840
ccccacacuc	gaugggccc	ccugcuacug	caacagcagc	uuucagcuuc	aggcagaugg	900
caagaccugc	aaagauuuug	augagugcuc	aguguacggc	accugcagcc	agcuauagc	960
caacacagac	ggcuccuua	uauugggcug	uguugaagga	uaccuccugc	agccggauaa	1020
ccgcuccugc	aaggccaaga	acgagccagu	agaccggccc	ccugugcugu	ugauagccaa	1080
cucccagaac	aucuuggcca	cguaccugag	ugggggcccag	gugucuacca	ucacaccuac	1140
gagcacgcgg	cagaccacag	ccauggacuu	cagcuaugcc	aacgagaccg	uauugcgggu	1200
gcauguuggg	gacagugcug	cucagacgca	gcucaagugu	gcccgcaugc	cuggccuaaa	1260
gggcuuucgug	gaugagcaca	ccaaucaacu	cucccucagu	cugcaccacg	uggaacagau	1320
ggccaucgac	uggcugacag	gcaacuucua	cuuuguggau	gacaucgaug	auaggauuu	1380
ugucugcaac	agaaaugggg	acacauugugu	cacauugcua	gaccuggaac	ucuacaaccc	1440
caagggcguu	gcccuggacc	cugccauggg	gaagguguuu	uucacugacu	augggcagau	1500
cccaaaggug	gaacgcugug	acauggaugg	gcagaaccgc	accaagcucg	ucgacagcaa	1560
gauuguguuu	ccucauggca	ucacgcugga	ccuggucagc	cgccuugucu	acugggcaga	1620
ugccuauucug	gacuauuuug	aaguggugga	cuaugagggc	aaggggccgc	agaccaucau	1680
ccagggcgauc	cugauugagc	accuguaagg	ccugacugug	uuugagaauu	aucucuaugc	1740
caccaacucg	gacaaugcc	augcccagca	gaagacgagu	gugaucggug	ugaaccgcuu	1800
uaacagcacc	gaguaccagg	uugucacccg	gguggacaag	gguggugccc	uccacaucua	1860
ccaccagagg	cgucagcccc	gagugaggag	ccaugccugu	gaaaacgacc	aguaugggaa	1920

gccgggguggc	ugcucugaca	ucugccugcu	ggccaacagc	cacaaggcgc	ggaccugccg	1980
cugccguucc	ggcuucagcc	ugggcaguga	cgggaaguca	ugcaagaagc	cggagcauga	2040
gcuguuccuc	guguauggca	agggccggcc	aggcaucauc	cggggcaugg	auaugggggc	2100
caaggucccg	gaugagcaca	ugaucuccau	ugaaaaccuc	augaaccccc	gagcccugga	2160
cuuccacgcu	gagaccggcu	ucaucuacuu	ugccgacacc	accagcuacc	ucauuggccg	2220
ccagaagauu	gauggcacug	agcgggagac	cauccugaag	gacggcaucc	acaauuguga	2280
ggguguggcc	guggacugga	ugggagacaa	ucuguacugg	acggacgaug	ggcccaaaaa	2340
gacaaucagc	guggccaggc	uggagaaagc	ugcucagacc	cgcaagacuu	uaaucgaggg	2400
caaaaugaca	caccccaggg	cuauuguggu	ggauccacuc	aaugggugga	uguacuggac	2460
agacugggag	gaggacccca	aggacagucg	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	gugaccuuc	ugcgaguga	2820
gcggcccccc	aucuuugaga	uccgaaugua	ugaugcccag	cagcagcaag	uuggcaccaa	2880
caaaugccgg	gugaacaau	gcggcugcag	cagccugugc	uuggccaccc	cugggagccg	2940
ccagugcgcc	ugugcugagg	accagguguu	ggacgcagac	ggcgucacuu	gcuuggcgaa	3000
cccauccuac	gugccuccac	cccagugcca	gccaggcgag	uuugccugug	ccaacagccg	3060
cugcauccag	gagcgugga	agugugacgg	agacaacgau	ugccuggaca	acagugauga	3120
ggccccagcc	cucugccauc	agcacaccug	ccccucggac	cgauucaagu	gcgagaacaa	3180
ccggugcauc	cccaaccgcu	ggcucugcga	cggggacaau	gacuguggga	acagugaaga	3240
ugaguccaau	gccacuuguu	cagcccgcac	cugccccccc	aaccaguucu	ccugugccag	3300
uggccgcugc	auccccaucu	ccuggacgug	ugaucuggau	gacgacugug	gggaccgcuc	3360
ugaugagucu	gcuucgugug	ccuaucccac	cugcuucccc	cugacucagu	uuaccugcaa	3420
caauggcaga	uguaucaaca	ucaacuggag	augcgacaau	gacaaugacu	guggggacaa	3480
cagugacgaa	gccggcugca	gccacuccug	uucuagcacc	caguucaagu	gcaacagcgg	3540
gcguugcauc	cccagcgacu	ggaccugcga	uggggacaau	gacugcggag	acuacaguga	3600
ugagacacac	gccaacugca	ccaaccaggc	cacgaggccc	ccugguggcu	gccacacuga	3660
ugaguuccag	ugccggcgug	auggacuau	caucccccug	cgguggcgcu	gcgaugggga	3720
cacugacugc	auggacucca	gcgaugagaa	gagcugugag	ggagugaccc	acgucugcga	3780

ucccaguguc	aaguuuggu	gcaaggacuc	agcucggugc	aucagcaaag	cgugggugug	3840
ugauggcgac	augacugug	aggauaacuc	ggacgaggag	aacugcgagu	cccuggccug	3900
caggccaccc	ucgcacccuu	gugccaacaa	caccucaguc	ugccugcccc	cugacaagcu	3960
gugugauggc	aacgacgacu	guggcgacgg	cucagaugag	ggcgagcucu	gcgaccagug	4020
cucucugaau	aacgguggcu	gcagccacaa	cugcucagug	gcaccuggcg	aaggcauugu	4080
guguuccugc	ccucugggca	uggagcuggg	gcccagacaac	cacaccugcc	agauccagag	4140
cuacugugcc	aagcaucuca	aaugcagcca	aaagugcgac	cagaacaagu	ucagcgugaa	4200
gugcuccugc	uacgagggcu	ggguccugga	accugacggc	gagagcugcc	gcagccugga	4260
ccccuucag	ccguucauca	uuuucuccaa	ccgccaugaa	auccggcgca	ucgaucuuca	4320
caaaggagac	uacagcgucc	uggugccccg	ccugcgcaac	accaucgccc	uggacuucca	4380
ccucagccag	agcgcccucu	acuggaccga	cgugguggag	gacaagaucu	accgcgggaa	4440
gcugcuggac	aacggagccc	ugacuaguuu	cgagguggug	auucaguaug	gccuggccac	4500
acccgagggc	cuggcuguag	acuggauugc	aggcaacauc	uacugggugg	agaguaaccu	4560
ggaucagauc	gagguggcca	agcuggaugg	gaccucccg	accaccugc	uggccgguga	4620
cauugagcac	ccaagggcaa	ucgcacugga	uccccgggau	gggauccugu	uuuggacaga	4680
cuggggaugc	agccugcccc	gcauugaggc	agccuccaug	aguggggcug	ggcgccgcac	4740
cgugcaccgg	gagaccggcu	cuggggggcug	gcccacacgg	cucaccgugg	acuaccugga	4800
gaagcgcauc	cuuuggauug	acgccagguc	agaugccauu	uacucagccc	guuacgacgg	4860
cucuggccac	auggaggugc	uucggggaca	cgaguuccug	ucgcacccgu	uugcagugac	4920
gcuguacggg	ggggaggucu	acuggacuga	cuggcgaaac	aacacacugg	cuaaggccaa	4980
caaguggacc	ggccacaau	ucaccguggu	acagaggacc	aacaccagc	ccuuugaccu	5040
gcagguguac	caccuccucc	gccagcccau	ggcucccacu	cccugugagg	ccaauggggg	5100
ccagggcccc	ugcucccacc	ugugucucuu	caacuacaac	cggaccgugu	ccugcgccug	5160
ccccaccuc	augaagcucc	acaaggacaa	caccaccugc	uauaguuua	agaaguuccu	5220
gcuguacgca	cgucagaugg	agauccgagg	uguggaccug	gaugcucccu	acuacaacua	5280
caucaucucc	uucacggugc	ccgacaucga	caacgucaca	gugcuagacu	acgaugcccg	5340
cgagcagcgu	guguacuggu	cugacgugcg	gacacaggcc	aucaagcggg	ccuucacuaa	5400
cggcacaggc	guggagacag	ucgucucugc	agacuugcca	aaugcccacg	ggcuggcugu	5460
ggacuggguc	ucccgaaacc	uguucuggac	aagcuauagc	accaauaaga	agcagaucua	5520
uguggccccg	cuggauggcu	ccuucagaag	cgcaguggug	cagggccugg	agcagcccca	5580
uggccuuguc	guccaccuc	ugcgugggaa	gcucuacugg	accgauggug	acaacaucag	5640
cauggccaac	auggauggca	gcaaucgcac	ccugcucuuc	aguggccaga	agggccccgu	5700

gggccugggcu	auugacuucc	cugaaagcaa	acucuacugg	aucagcuccg	ggaaccuac	5760
caucaaccgc	ugcaaccugg	augggagugg	gcuggagggc	aucgaugcca	ugcggagcca	5820
gcuggggcaag	gccaccgccc	uggccaucuu	gggggacaag	cugugggugg	cugaucaggu	5880
gucggaaaag	augggcacau	gcagcaaggc	ugacggcucg	ggcuccgugg	uccuucggaa	5940
cagcaccacc	cuggugaugc	acaugaaggu	cuauagcag	agcauccagc	uggaccuuaa	6000
gggcaccaac	cccugcagug	ucaacaacgg	ugacugcucc	cagcucugcc	ugcccacguc	6060
agagacgacc	cgcuccugca	ugugcacagc	cggcuauagc	cuccggagug	gccagcaggc	6120
cugcgagggc	guagguuccu	uucuccugua	cucugugcau	gagggaauc	ggggaaaucc	6180
ccuggauccc	aaugacaagu	cagaugcccu	ggucccagug	uccgggaccu	cgcuggcugu	6240
cggcaucgac	uuccacgcug	aaaugacac	caucuacugg	guggacaugg	gccugagcac	6300
gaucagccgg	gccaaagcgg	accagacgug	gcgugaagac	guggugacca	auggcauugg	6360
ccguguggag	ggcauugcag	uggacuggau	cgcaggcaac	aucuacugga	cagaccaggg	6420
cuuugauguc	aucgaggucg	cccggcucua	uggcuccuuc	cgcuacgugg	ugaucuccca	6480
gggucuaagc	aagccccggg	ccaucaccgu	ccaccgggag	aaaggguacu	uguucuggac	6540
ugaguggggu	caguauccgc	guauugagcg	gucucggcua	gauggcacgg	agcguguggu	6600
gcuggucaa	gucagcauca	gcuggcccaa	cggcaucuca	guggacuacc	aggaugggaa	6660
gcuguacugg	ugcgaugcac	ggacagacaa	gauugaacgg	aucgaccugg	agacagguga	6720
gaaccgagag	gugguucugu	ccagcaacaa	cauggacaug	uuuucagugu	cuguguuuga	6780
ggauuucauc	uacuggagug	acaggacuca	ugccaacggc	ucuaucagc	gcgggagcaa	6840
agacaaugcc	acagacuccg	ugccccugcg	aaccggcauc	ggcguccagc	uuaaagacau	6900
caaagucuu	aaccgggacc	ggcagaaagg	caccaacgug	ugcgcggugg	ccaauggcgg	6960
gugccagcag	cugugccugu	accggggccg	ugggcagcgg	gccugcgccu	gugcccacgg	7020
gaugcuggcu	gaagacggag	caucgugccg	cagauaugcc	ggcuaccugc	ucuacucaga	7080
gcgcaccauu	cucaagagua	uccaccuguc	ggaugagcgc	aaccucaaug	cggccgugca	7140
gcccucgag	gaccucgagc	acaugaagaa	cgucaucgcc	cuggccuuug	acuaccgggc	7200
aggcaccucu	cggggcacc	ccaaucgcau	cuucucagc	gacauccacu	uugggaacau	7260
ccaacagauc	aacgacgaug	gcuccaggag	gaucaccauu	guggaaaacg	ugggcuccgu	7320
ggaaggccug	gccuauacc	guggcuggga	cacucucua	uggacaagcu	acacgacau	7380
caccaucacg	cggcacacag	uggaccagac	ccggccaggg	gccuucgagc	gugagaccgu	7440
caucacuaug	ucuggagaug	accaccacg	ggccuucguu	uuggacgagu	gccagaaccu	7500
cauguucugg	accaacugga	augagcagca	ucccagcauc	augcgggagg	cgcucucggg	7560

agccaauguc	cugacccuua	ucgagaagga	cauccguacc	cccaauggcc	uggccaucga	7620
ccaccgugcc	gagaagcucu	acuucucuga	cgccacccug	gacaagaucg	agcggugcga	7680
guaugacggc	ucccaccgcu	augugauccu	aaagucagag	ccuguccacc	ccuucgggcu	7740
ggccgugauu	ggggagcaca	uuuucuggac	ugacugggug	cggcgggcag	ugcagcgggc	7800
caacaagcac	gugggagca	acaugaagcu	gcugcgcgug	gacauccccc	agcagcccau	7860
gggcaucauc	gccguggcca	acgacaccaa	cagcugugaa	cucucuccau	gccgaaucaa	7920
caacgguggc	ugccaggacc	ugugucugcu	cacucaccag	ggccauguca	acugcucaug	7980
ccgagggggc	cgaauccucc	aggaugaccu	caccugccga	gcggugaaau	ccucuugccg	8040
agcacaagau	gaguuugagu	gugccaauug	cgagugcauc	aacuucagcc	ugaccugcga	8100
cggcgucucc	cacugcaagg	acaaguccga	ugagaagcca	uccuacugca	acucccgccg	8160
cugcaagaag	acuuccggc	agugcagcaa	ugggcgcugu	guguccaaca	ugcuguggug	8220
caacggggcc	gacgacugug	gggauggcuc	ugacgagauc	ccuugcaaca	agacagccug	8280
uggugugggc	gaguuccgcu	gccgggacgg	gaccugcauc	gggaacucca	gccgcugcaa	8340
ccaguuugug	gauugugagg	acgccucaga	ugagaugaac	ugcagugcca	ccgacugcag	8400
cagcuacuuc	cgccuggggc	ugaagggcg	gcucuuccag	cccugcgagc	ggaccucacu	8460
cugcuacgca	cccagcuggg	ugugugaugg	cgccaugac	uguggggacu	acagugauga	8520
gcgcgacugc	ccagguguga	aacgccccag	augcccucug	aauuacuucg	ccugcccuag	8580
ugggcgcugc	auccccauga	gcuggacgug	ugacaaagag	gaugacugug	aacauggcga	8640
ggacgagacc	cacugcaaca	aguucugcuc	agaggcccag	uuugagugcc	agaaccaucg	8700
cugcaucucc	aagcaguggc	ugugugacgg	cagcgaugac	uguggggaug	gcucagacga	8760
ggcugcucac	ugugaaggca	agacgugcgg	ccccuccucc	uucuccugcc	cuggcaccca	8820
cgugugcguc	cccagcgcu	ggcucuguga	cggugacaaa	gacugugcug	auggugcaga	8880
cgagagcauc	gcagcugguu	gcuuguacaa	cagcacuugu	gacgaccgug	aguucaugug	8940
ccagaaccgc	cagugcaucc	ccaagcacuu	cgugugugac	cacgaccgug	acugugcaga	9000
uggcucugau	gaguccccc	agugugagua	cccgaccugc	ggccccagug	aguucccgug	9060
ugccaauggg	cgcugucuga	gcucccgcca	gugggagugu	gauggcgaga	augacugcca	9120
cgaccagagu	gacgaggcuc	ccaagaaccc	acacugcacc	agccaagagc	acaagugcaa	9180
ugccucguca	caguuccugu	gcagcagugg	gcgcugugug	gcugaggcac	ugcucugcaa	9240
cggccaggau	gacuguggcg	acagcucgga	cgagcguggc	ugccacauca	augagugucu	9300
cagccgcaag	cucaguggcu	gcagccagga	cugugaggac	cucaagaucg	gcuucaagug	9360
ccgcugucgc	ccuggcuucc	ggcugaagga	cgacggccgg	acgugugcug	auguggacga	9420
gugcagcacc	accuuccccu	gcagccagcg	cugcaucaac	acucauggca	gcuauaagug	9480

ucugugugug	gagggcuaug	caccccgcg	cggcgacccc	cacagcugca	aggcugugac	9540
ugacgaggaa	ccguuucuga	ucuucgccaa	ccgguacuac	cugcgcaagc	ucaaccugga	9600
cggguccaac	uacacguuac	uuaagcaggg	ccugaacaac	gccguugccu	uggauuuuga	9660
cuaccgagag	cagaugaucu	acuggacaga	ugugaccacc	cagggcagca	ugauccgaag	9720
gaugcaccuu	aacgggagca	augugcaggu	ccuacaccgu	acaggccuca	gcaaccccga	9780
ugggcuggcu	guggacuggg	uggguggcaa	ccuguacugg	ugcgacaaag	gccgggacac	9840
caucgaggug	uccaagcuca	augggggccua	ucggacggug	cuggucagcu	cuggccuccg	9900
ugagcccagg	gcucuggugg	uggaugugca	gaauugguac	cuguacugga	cagacugggg	9960
ugaccuuca	cugaucggcc	gcaucggcgu	ggauugggucc	agccgcagcg	ucaucgugga	10020
caccaagauc	acauggccca	augggccugac	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	gccccgacag	uuccagugcu	ccacaggauu	10620
cugcacaac	ccugccuua	ucugcgauug	cgacaauagc	ugccaggaca	acagugacga	10680
ggccaacugu	gacauccacg	ucugcuugcc	cagucaguuc	aaaugcacca	acaccaaccg	10740
cuguaauucc	ggcaucuucc	gcugcaauug	gcaggacaac	ugcggagaug	gggagggaug	10800
gagggacugc	cccgagguga	ccugcgcccc	caaccaguuc	cagugcucca	uuaccaaaccg	10860
gugcaucccc	cgggucuggg	ucugcgaccg	ggacaauagc	uguguggaug	gcagugauga	10920
gcccgcaca	ugcaccacga	ugaccugugg	uguggacgag	uuccgcugca	aggauucggg	10980
ccgcugcauc	ccagcgcggu	ggaaguguga	cgagaggau	gacugugggg	auggcucgga	11040
ugagcccaag	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
cgaagaagac	ugcaccccc	gcugugacau	ggaccaguuc	cagugcaaga	gcggccacug	11340

cauuuuuuug	cgcugggcgc	gugacgcaga	cgcgcacugc	auggacggca	gcgacgagga	11400
ggccugcggc	acugggcugc	ggaccugccc	ccuggcagag	uuccagugca	acaacaccuu	11460
gugcaagccg	cuggccugga	agugcgauug	cgaggauagc	uguggggaca	acucagauga	11520
gaaccccgag	gagugugccc	gguuucgug	ccuuuuuac	cggcccuucc	guugcaagaa	11580
ugaccgcguc	ugucugugga	ucgggcgcca	augcgauugc	acggacaacu	guggggagug	11640
gacugaugaa	gaggacugug	agccccccac	agcccacacc	acccacugca	aagacaagaa	11700
ggaguuuucg	ugccggaacc	agcgcugccu	cuccuccucc	cugcgcugca	acauguucga	11760
ugacugcggg	gacggcucug	acgaggagga	cugcagcauc	gaccccaagc	ugaccagcug	11820
cgcacccaau	gccagcaucu	guggggacga	ggcacgcugc	gugcgcaccg	agaaagcggc	11880
cuacugugcc	ugccgcucgg	gcuuccacac	cugucccggc	cagcccgga	gccaaagacau	11940
caacgagugc	cugcgcuuug	gcaccugcuc	ccagcucugc	aacaacacca	agggcgggca	12000
ccucugcagc	ugcgcucgga	acuucaugaa	gacgcacaac	accugcaagg	ccgaaggcuc	12060
ugaguaccag	guccuguaca	ucgcugauga	caaugagauc	cgcagccugu	uccccggcca	12120
cccccauucg	gcuuacgagc	aggcauucca	gggugacgag	aguguccgca	uugaugcuau	12180
ggauguccau	gucaaggcug	gccgugucua	uuggaccaac	uggcacacgg	gcaccaucuc	12240
cuaccgcagc	cugccaccug	cugcgcucc	uaccacuucc	aaccgccacc	ggcgacagau	12300
ugaccggggg	gucacccacc	ucaacauuuc	agggcugaag	augccagag	gcaucgccau	12360
cgcuggggug	gccggaaacg	uguacuggac	cgcucgggc	cgcagauuga	uugagguggc	12420
gcagaugaag	ggcgagaacc	gcaagacgcu	caucucgggc	augauugacg	agccccacgc	12480
cauuguggug	gacccacuga	gggggaccuu	guacugguca	gacuggggca	accaccccaa	12540
gauugagacg	gcagcgauug	augggacgcu	ucgggagaca	cuggugcagg	acaacauuca	12600
guggcccaca	ggccugggcg	uggauuauca	caaugagcgg	cuguacuggg	cagacgccaa	12660
gcuuucaguc	aucggcagca	uccggcucaa	uggcacggac	cccuuugugg	cugcugacag	12720
caaacgaggc	cuaagucacc	ccuucagcau	cgcgcucuuu	gaggauuaca	ucuauuggugu	12780
caccuacauc	aaauaucgug	ucuucaagau	ccauaaguuu	ggccacagcc	ccuuggucaa	12840
ccugacaggg	ggccugagcc	acgccucuga	cuggguccuu	uaccaucagc	acaagcagcc	12900
cgaagugacc	aacccaugug	accgcaagaa	augcgagugg	cucugccugc	ugagccccag	12960
uggggccuguc	ugcaccuguc	ccaauuggaa	gcggcugggc	aacggcacau	gcgugccugu	13020
gcccucucca	acgccccccc	cagaugcucc	ccggccugga	accuguaacc	ugcagugcuu	13080
caacgguggc	agcuguuuuc	ucaaugcacg	gaggcagccc	aagugccgcu	gccaaaccccg	13140
cuacacgggu	gacaagugug	aacuggacca	gugcuggggg	cacugucgca	augggggcac	13200
cugugcugcc	ucccccucug	gcaugccccc	gugccggugc	cccacgggcu	ucacggggcc	13260

caaaugcacc cagcaggugu gugcgggcuu cugugccaac aacagcaccu gcacugucuaa	13320
ccaggggcaac cagccccagu gccgaugccu acccgguuuc cugggcgacc gcugccagua	13380
ccggcagugc ucuggcuacu gugagaacuu uggcacauugc cagauggcug cugauggcuc	13440
ccgacaaugc cgcugcacug ccuacuuga gggauugagg ugugagguga acaaugcag	13500
ccgcugucuc gaaggggccu guguggucaa caagcagagu ggggauguca ccugcaacug	13560
cacggauggc cggguggccc ccagcugucu gaccugcguc ggccacugca gcaauggcgg	13620
cuccuguacc augaacagca aaaugaugcc ugagugccag ugcccccccc acaugacagg	13680
gccccggugu gaggagcacg ucuucagcca gcagcagcca ggacauauag ccuccauccu	13740
aaucccucug cuguugcugc ugcugcuggu ucugguggcc ggagugguau ucugguauaa	13800
gcggcgaguc caaggggcuu agggcuucca gcaccaacgg augaccaacg gggccaugaa	13860
cguggagauu ggaaaccccc ccuacaagau guacgaaggc ggagagccug augauguggg	13920
aggccuacug gacgcugacu uugcccugga ccugacaaag cccaccaacu ucaccaaccc	13980
cguguaugcc acacucuaca uggggggcca uggcagucgc cacucccugg ccagcacgga	14040
cgagaagcga gaacuccugg gccggggccc ugaggacgag auaggggacc ccuuggcaua	14100
ggggccugcc ccgucggacu gccccagaa agccuccugc cccugccgg ugaaguccuu	14160
cagugagccc cuccccagcc agcccuuccc uggccccgcc ggauauauaa auguaaaaau	14220
gaaggaaaua cauuuuauau gugagcgagc aagccggcaa gcgagcacag uauuuuuu	14280
ccaucuccuc ccugccugcu ccuuggcacc ccaugcugc cuucagggag acaggcagg	14340
agggcuuggg gcugcaccuc cuaccuccc accagaacgc accccacugg gagagcuggu	14400
ggugcagccu uccccuccu guauaagaca cuuugccaag gcucuccccu cugccccau	14460
cccugcuugc ccgcuccac agcuuccuga gggcuauuuc ugggaaggga gaguucuuug	14520
cugccccugu cuggaagacg uggcucuggg ugagguaggc gggaaaggau ggaguguuu	14580
aguucuuuggg ggaggccacc ccaaacccca gcccacacuc caggggcacc uaugagaugg	14640
ccaugcucaa cccccuccc agacaggccc ucccugucuc cagggccccc accgagguuc	14700
ccagggcugg agacuuccuc ugguaaaca uccuccagcc uccccuccc uggggacgcc	14760
aaggaggugg gccacaccca ggaaggga gggggcagcc ccguuuuggg gacgugaacg	14820
uuuuauauu uuuugcugaa uuccuuuaca acuaauaac acagauauug uuauaaaaa	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

				245						250						255
Lys	Cys	Ala	Arg	Met	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Phe	Val	Asp	Glu	His	Thr	
			260					265					270			
Ile	Asn	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	His	His	Val	Glu	Gln	Met	Ala	Ile	Asp	
		275					280					285				
Trp	Leu	Thr	Gly	Asn	Phe	Tyr	Phe	Val	Asp	Asp	Ile	Asp	Asp	Arg	Ile	
	290					295					300					
Phe	Val	Cys	Asn	Arg	Asn	Gly	Asp	Thr	Cys	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	
305					310					315					320	
Glu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Lys	Gly	Ile	Ala	Leu	Asp	Pro	Ala	Met	Gly	Lys	
			325						330					335		
Val	Phe	Phe	Thr	Asp	Tyr	Gly	Gln	Ile	Pro	Lys	Val	Glu	Arg	Cys	Asp	
			340					345					350			
Met	Asp	Gly	Gln	Asn	Arg	Thr	Lys	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	Ile	Val	Phe	
		355					360					365				
Pro	His	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	Leu	Val	Ser	Arg	Leu	Val	Tyr	Trp	Ala	
	370					375					380					
Asp	Ala	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ile	Glu	Val	Val	Asp	Tyr	Glu	Gly	Lys	Gly	
385					390					395					400	
Arg	Gln	Thr	Ile	Ile	Gln	Gly	Ile	Leu	Ile	Glu	His	Leu	Tyr	Gly	Leu	
			405					410						415		
Thr	Val	Phe	Glu	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Ala	Asn	
			420					425					430			
Ala	Gln	Gln	Lys	Thr	Ser	Val	Ile	Arg	Val	Asn	Arg	Phe	Asn	Ser	Thr	
		435					440					445				
Glu	Tyr	Gln	Val	Val	Thr	Arg	Val	Asp	Lys	Gly	Gly	Ala	Leu	His	Ile	
	450					455					460					
Tyr	His	Gln	Arg	Arg	Gln	Pro	Arg	Val	Arg	Ser	His	Ala	Cys	Glu	Asn	
465					470					475					480	
Asp	Gln	Tyr	Gly	Lys	Pro	Gly	Gly	Cys	Ser	Asp	Ile	Cys	Leu	Leu	Ala	
				485					490						495	

Asn Ser His Lys Ala Arg Thr Cys Arg Cys Arg Ser Gly Phe Ser Leu
 500 505 510

Gly Ser Asp Gly Lys Ser Cys Lys Lys Pro Glu His Glu Leu Phe Leu
 515 520 525

Val Tyr Gly Lys Gly Arg Pro Gly Ile Ile Arg Gly Met Asp Met Gly
 530 535 540

Ala Lys Val Pro Asp Glu His Met Ile Pro Ile Glu Asn Leu Met Asn
 545 550 555 560

Pro Arg Ala Leu Asp Phe His Ala Glu Thr Gly Phe Ile Tyr Phe Ala
 565 570 575

Asp Thr Thr Ser Tyr Leu Ile Gly Arg Gln Lys Ile Asp Gly Thr Glu
 580 585 590

Arg Glu Thr Ile Leu Lys Asp Gly Ile His Asn Val Glu Gly Val Ala
 595 600 605

Val Asp Trp Met Gly Asp Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Asp Gly Pro Lys
 610 615 620

Lys Thr Ile Ser Val Ala Arg Leu Glu Lys Ala Ala Gln Thr Arg Lys
 625 630 635 640

Thr Leu Ile Glu Gly Lys Met Thr His Pro Arg Ala Ile Val Val Asp
 645 650 655

Pro Leu Asn Gly Trp Met Tyr Trp Thr Asp Trp Glu Glu Asp Pro Lys
 660 665 670

Asp Ser Arg Arg Gly Arg Leu Glu Arg Ala Trp Met Asp Gly Ser His
 675 680 685

Arg Asp Ile Phe Val Thr Ser Lys Thr Val Leu Trp Pro Asn Gly Leu
 690 695 700

Ser Leu Asp Ile Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ala Phe Tyr
 705 710 715 720

Asp Arg Ile Glu Thr Ile Leu Leu Asn Gly Thr Asp Arg Lys Ile Val
 725 730 735

Tyr Glu Gly Pro Glu Leu Asn His Ala Phe Gly Leu Cys His His Gly
 740 745 750

Asn Tyr Leu Phe Trp Thr Glu Tyr Arg Ser Gly Ser Val Tyr Arg Leu
 755 760 765
 Glu Arg Gly Val Gly Gly Ala Pro Pro Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser
 770 775 780
 Glu Arg Pro Pro Ile Phe Glu Ile Arg Met Tyr Asp Ala Gln Gln Gln
 785 790 795 800
 Gln Val Gly Thr Asn Lys Cys Arg Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser Ser
 805 810 815
 Leu Cys Leu Ala Thr Pro Gly Ser Arg Gln Cys Ala Cys Ala Glu Asp
 820 825 830
 Gln Val Leu Asp Ala Asp Gly Val Thr Cys Leu Ala Asn Pro Ser Tyr
 835 840 845
 Val Pro Pro Pro Gln Cys Gln Pro Gly Glu Phe Ala Cys Ala Asn Ser
 850 855 860
 Arg Cys Ile Gln Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Leu
 865 870 875 880
 Asp Asn Ser Asp Glu Ala Pro Ala Leu Cys His Gln His Thr Cys Pro
 885 890 895
 Ser Asp Arg Phe Lys Cys Glu Asn Asn Arg Cys Ile Pro Asn Arg Trp
 900 905 910
 Leu Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asn Ser Glu Asp Glu Ser Asn
 915 920 925
 Ala Thr Cys Ser Ala Arg Thr Cys Pro Pro Asn Gln Phe Ser Cys Ala
 930 935 940
 Ser Gly Arg Cys Ile Pro Ile Ser Trp Thr Cys Asp Leu Asp Asp Asp
 945 950 955 960
 Cys Gly Asp Arg Ser Asp Glu Ser Ala Ser Cys Ala Tyr Pro Thr Cys
 965 970 975
 Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile Asn Ile
 980 985 990
 Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu
 995 1000 1005

Ala Gly 1010	Cys Ser His Ser 1015	Cys Ser Ser Thr Gln Phe 1020	Lys Cys Asn
Ser Gly 1025	Arg Cys Ile Pro Glu 1030	His Trp Thr Cys Asp 1035	Gly Asp Asn
Asp Cys 1040	Gly Asp Tyr Ser Asp 1045	Glu Thr His Ala Asn 1050	Cys Thr Asn
Gln Ala 1055	Thr Arg Pro Pro Gly 1060	Gly Cys His Thr Asp 1065	Glu Phe Gln
Cys Arg 1070	Leu Asp Gly Leu Cys 1075	Ile Pro Leu Arg Trp 1080	Arg Cys Asp
Gly Asp 1085	Thr Asp Cys Met Asp 1090	Ser Ser Asp Glu Lys 1095	Ser Cys Glu
Gly Val 1100	Thr His Val Cys Asp 1105	Pro Ser Val Lys Phe 1110	Gly Cys Lys
Asp Ser 1115	Ala Arg Cys Ile Ser 1120	Lys Ala Trp Val Cys 1125	Asp Gly Asp
Asn Asp 1130	Cys Glu Asp Asn Ser 1135	Asp Glu Glu Asn Cys 1140	Glu Ser Leu
Ala Cys 1145	Arg Pro Pro Ser His 1150	Pro Cys Ala Asn Asn 1155	Thr Ser Val
Cys Leu 1160	Pro Pro Asp Lys Leu 1165	Cys Asp Gly Asn Asp 1170	Asp Cys Gly
Asp Gly 1175	Ser Asp Glu Gly Glu 1180	Leu Cys Asp Gln Cys 1185	Ser Leu Asn
Asn Gly 1190	Gly Cys Ser His Asn 1195	Cys Ser Val Ala Pro 1200	Gly Glu Gly
Ile Val 1205	Cys Ser Cys Pro Leu 1210	Gly Met Glu Leu Gly 1215	Pro Asp Asn
His Thr 1220	Cys Gln Ile Gln Ser 1225	Tyr Cys Ala Lys His 1230	Leu Lys Cys
Ser Gln	Lys Cys Asp Gln Asn	Lys Phe Ser Val Lys	Cys Ser Cys

1235		1240		1245
Tyr Glu Gly Trp Val Leu Glu Pro Asp Gly Glu Ser Cys Arg Ser				
1250		1255		1260
Leu Asp Pro Phe Lys Pro Phe Ile Ile Phe Ser Asn Arg His Glu				
1265		1270		1275
Ile Arg Arg Ile Asp Leu His Lys Gly Asp Tyr Ser Val Leu Val				
1280		1285		1290
Pro Gly Leu Arg Asn Thr Ile Ala Leu Asp Phe His Leu Ser Gln				
1295		1300		1305
Ser Ala Leu Tyr Trp Thr Asp Val Val Glu Asp Lys Ile Tyr Arg				
1310		1315		1320
Gly Lys Leu Leu Asp Asn Gly Ala Leu Thr Ser Phe Glu Val Val				
1325		1330		1335
Ile Gln Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp				
1340		1345		1350
Ile Ala Gly Asn Ile Tyr Trp Val Glu Ser Asn Leu Asp Gln Ile				
1355		1360		1365
Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Thr Leu Arg Thr Thr Leu Leu Ala				
1370		1375		1380
Gly Asp Ile Glu His Pro Arg Ala Ile Ala Leu Asp Pro Arg Asp				
1385		1390		1395
Gly Ile Leu Phe Trp Thr Asp Trp Asp Ala Ser Leu Pro Arg Ile				
1400		1405		1410
Glu Ala Ala Ser Met Ser Gly Ala Gly Arg Arg Thr Val His Arg				
1415		1420		1425
Glu Thr Gly Ser Gly Gly Trp Pro Asn Gly Leu Thr Val Asp Tyr				
1430		1435		1440
Leu Glu Lys Arg Ile Leu Trp Ile Asp Ala Arg Ser Asp Ala Ile				
1445		1450		1455
Tyr Ser Ala Arg Tyr Asp Gly Ser Gly His Met Glu Val Leu Arg				
1460		1465		1470

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			

Gly Lys	Leu Tyr Trp Thr Asp	Gly Asp Asn Ile Ser	Met Ala Asn
1715	1720	1725	
Met Asp	Gly Ser Asn Arg Thr	Leu Leu Phe Ser Gly	Gln Lys Gly
1730	1735	1740	
Pro Val	Gly Leu Ala Ile Asp	Phe Pro Glu Ser Lys	Leu Tyr Trp
1745	1750	1755	
Ile Ser	Ser Gly Asn His Thr	Ile Asn Arg Cys Asn	Leu Asp Gly
1760	1765	1770	
Ser Gly	Leu Glu Val Ile Asp	Ala Met Arg Ser Gln	Leu Gly Lys
1775	1780	1785	
Ala Thr	Ala Leu Ala Ile Met	Gly Asp Lys Leu Trp	Trp Ala Asp
1790	1795	1800	
Gln Val	Ser Glu Lys Met Gly	Thr Cys Ser Lys Ala	Asp Gly Ser
1805	1810	1815	
Gly Ser	Val Val Leu Arg Asn	Ser Thr Thr Leu Val	Met His Met
1820	1825	1830	
Lys Val	Tyr Asp Glu Ser Ile	Gln Leu Asp His Lys	Gly Thr Asn
1835	1840	1845	
Pro Cys	Ser Val Asn Asn Gly	Asp Cys Ser Gln Leu	Cys Leu Pro
1850	1855	1860	
Thr Ser	Glu Thr Thr Arg Ser	Cys Met Cys Thr Ala	Gly Tyr Ser
1865	1870	1875	
Leu Arg	Ser Gly Gln Gln Ala	Cys Glu Gly Val Gly	Ser Phe Leu
1880	1885	1890	
Leu Tyr	Ser Val His Glu Gly	Ile Arg Gly Ile Pro	Leu Asp Pro
1895	1900	1905	
Asn Asp	Lys Ser Asp Ala Leu	Val Pro Val Ser Gly	Thr Ser Leu
1910	1915	1920	
Ala Val	Gly Ile Asp Phe His	Ala Glu Asn Asp Thr	Ile Tyr Trp
1925	1930	1935	
Val Asp	Met Gly Leu Ser Thr	Ile Ser Arg Ala Lys	Arg Asp Gln
1940	1945	1950	

Thr	Trp	Arg	Glu	Asp	Val	Val	Thr	Asn	Gly	Ile	Gly	Arg	Val	Glu
1955						1960					1965			
Gly	Ile	Ala	Val	Asp	Trp	Ile	Ala	Gly	Asn	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp
1970						1975					1980			
Gln	Gly	Phe	Asp	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Asn	Gly	Ser	Phe
1985						1990					1995			
Arg	Tyr	Val	Val	Ile	Ser	Gln	Gly	Leu	Asp	Lys	Pro	Arg	Ala	Ile
2000						2005					2010			
Thr	Val	His	Pro	Glu	Lys	Gly	Tyr	Leu	Phe	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly
2015						2020					2025			
Gln	Tyr	Pro	Arg	Ile	Glu	Arg	Ser	Arg	Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Arg
2030						2035					2040			
Val	Val	Leu	Val	Asn	Val	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Asn	Gly	Ile	Ser
2045						2050					2055			
Val	Asp	Tyr	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Tyr	Trp	Cys	Asp	Ala	Arg	Thr
2060						2065					2070			
Asp	Lys	Ile	Glu	Arg	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Gly	Glu	Asn	Arg	Glu
2075						2080					2085			
Val	Val	Leu	Ser	Ser	Asn	Asn	Met	Asp	Met	Phe	Ser	Val	Ser	Val
2090						2095					2100			
Phe	Glu	Asp	Phe	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asp	Arg	Thr	His	Ala	Asn	Gly
2105						2110					2115			
Ser	Ile	Lys	Arg	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Asp	Ser	Val	Pro
2120						2125					2130			
Leu	Arg	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Gln	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Val	Phe
2135						2140					2145			
Asn	Arg	Asp	Arg	Gln	Lys	Gly	Thr	Asn	Val	Cys	Ala	Val	Ala	Asn
2150						2155					2160			
Gly	Gly	Cys	Gln	Gln	Leu	Cys	Leu	Tyr	Arg	Gly	Arg	Gly	Gln	Arg
2165						2170					2175			
Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	His	Gly	Met	Leu	Ala	Glu	Asp	Gly	Ala	Ser

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			

Pro Val 2420	His Pro Phe Gly 2425	Leu Ala Val Tyr Gly Glu 2430	His Ile Phe
Trp Thr 2435	Asp Trp Val Arg Arg 2440	Ala Val Gln Arg Ala 2445	Asn Lys His
Val Gly 2450	Ser Asn Met Lys Leu 2455	Leu Arg Val Asp Ile 2460	Pro Gln Gln
Pro Met 2465	Gly Ile Ile Ala Val 2470	Ala Asn Asp Thr Asn 2475	Ser Cys Glu
Leu Ser 2480	Pro Cys Arg Ile Asn 2485	Asn Gly Gly Cys Gln 2490	Asp Leu Cys
Leu Leu 2495	Thr His Gln Gly His 2500	Val Asn Cys Ser Cys 2505	Arg Gly Gly
Arg Ile 2510	Leu Gln Asp Asp Leu 2515	Thr Cys Arg Ala Val 2520	Asn Ser Ser
Cys Arg 2525	Ala Gln Asp Glu Phe 2530	Glu Cys Ala Asn Gly 2535	Glu Cys Ile
Asn Phe 2540	Ser Leu Thr Cys Asp 2545	Gly Val Pro His Cys 2550	Lys Asp Lys
Ser Asp 2555	Glu Lys Pro Ser Tyr 2560	Cys Asn Ser Arg Arg 2565	Cys Lys Lys
Thr Phe 2570	Arg Gln Cys Ser Asn 2575	Gly Arg Cys Val Ser 2580	Asn Met Leu
Trp Cys 2585	Asn Gly Ala Asp Asp 2590	Cys Gly Asp Gly Ser 2595	Asp Glu Ile
Pro Cys 2600	Asn Lys Thr Ala Cys 2605	Gly Val Gly Glu Phe 2610	Arg Cys Arg
Asp Gly 2615	Thr Cys Ile Gly Asn 2620	Ser Ser Arg Cys Asn 2625	Gln Phe Val
Asp Cys 2630	Glu Asp Ala Ser Asp 2635	Glu Met Asn Cys Ser 2640	Ala Thr Asp
Cys Ser 2645	Ser Tyr Phe Arg Leu 2650	Gly Val Lys Gly Val 2655	Leu Phe Gln

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

Ser	Gln	Glu	His	Lys	Cys	Asn	Ala	Ser	Ser	Gln	Phe	Leu	Cys	Ser
2900						2905					2910			
Ser	Gly	Arg	Cys	Val	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Cys	Asn	Gly	Gln	Asp
2915						2920					2925			
Asp	Cys	Gly	Asp	Ser	Ser	Asp	Glu	Arg	Gly	Cys	His	Ile	Asn	Glu
2930						2935					2940			
Cys	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Gly	Cys	Ser	Gln	Asp	Cys	Glu	Asp
2945						2950					2955			
Leu	Lys	Ile	Gly	Phe	Lys	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu
2960						2965					2970			
Lys	Asp	Asp	Gly	Arg	Thr	Cys	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ser	Thr
2975						2980					2985			
Thr	Phe	Pro	Cys	Ser	Gln	Arg	Cys	Ile	Asn	Thr	His	Gly	Ser	Tyr
2990						2995					3000			
Lys	Cys	Leu	Cys	Val	Glu	Gly	Tyr	Ala	Pro	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro
3005						3010					3015			
His	Ser	Cys	Lys	Ala	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Pro	Phe	Leu	Ile	Phe
3020						3025					3030			
Ala	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Lys	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Ser	Asn
3035						3040					3045			
Tyr	Thr	Leu	Leu	Lys	Gln	Gly	Leu	Asn	Asn	Ala	Val	Ala	Leu	Asp
3050						3055					3060			
Phe	Asp	Tyr	Arg	Glu	Gln	Met	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Val	Thr	Thr
3065						3070					3075			
Gln	Gly	Ser	Met	Ile	Arg	Arg	Met	His	Leu	Asn	Gly	Ser	Asn	Val
3080						3085					3090			
Gln	Val	Leu	His	Arg	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro	Asp	Gly	Leu	Ala
3095						3100					3105			
Val	Asp	Trp	Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Tyr	Trp	Cys	Asp	Lys	Gly	Arg
3110						3115					3120			
Asp	Thr	Ile	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Asn	Gly	Ala	Tyr	Arg	Thr	Val

3125		3130		3135
Leu Val Ser Ser Gly Leu Arg Glu Pro Arg Ala Leu Val Val Asp				
3140		3145		3150
Val Gln Asn Gly Tyr Leu Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Asp His Ser				
3155		3160		3165
Leu Ile Gly Arg Ile Gly Met Asp Gly Ser Ser Arg Ser Val Ile				
3170		3175		3180
Val Asp Thr Lys Ile Thr Trp Pro Asn Gly Leu Thr Leu Asp Tyr				
3185		3190		3195
Val Thr Glu Arg Ile Tyr Trp Ala Asp Ala Arg Glu Asp Tyr Ile				
3200		3205		3210
Glu Phe Ala Ser Leu Asp Gly Ser Asn Arg His Val Val Leu Ser				
3215		3220		3225
Gln Asp Ile Pro His Ile Phe Ala Leu Thr Leu Phe Glu Asp Tyr				
3230		3235		3240
Val Tyr Trp Thr Asp Trp Glu Thr Lys Ser Ile Asn Arg Ala His				
3245		3250		3255
Lys Thr Thr Gly Thr Asn Lys Thr Leu Leu Ile Ser Thr Leu His				
3260		3265		3270
Arg Pro Met Asp Leu His Val Phe His Ala Leu Arg Gln Pro Asp				
3275		3280		3285
Val Pro Asn His Pro Cys Lys Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser Asn				
3290		3295		3300
Leu Cys Leu Leu Ser Pro Gly Gly Gly His Lys Cys Ala Cys Pro				
3305		3310		3315
Thr Asn Phe Tyr Leu Gly Ser Asp Gly Arg Thr Cys Val Ser Asn				
3320		3325		3330
Cys Thr Ala Ser Gln Phe Val Cys Lys Asn Asp Lys Cys Ile Pro				
3335		3340		3345
Phe Trp Trp Lys Cys Asp Thr Glu Asp Asp Cys Gly Asp His Ser				
3350		3355		3360

Arg	Pro	Gly	Gln
3375			
Ala	Phe	Ile	Cys
3390			
Glu	Ala	Asn	Cys
3405			
Cys	Thr	Asn	Thr
3420			
Gly	Gln	Asp	Asn
3435			
Glu	Val	Thr	Cys
3450			
Arg	Cys	Ile	Pro
3465			
Val	Asp	Gly	Ser
3480			
Gly	Val	Asp	Glu
3495			
Ala	Arg	Trp	Lys
3510			
Asp	Glu	Pro	Lys
3525			
Gln	Phe	Arg	Cys
3540			
Cys	Asp	Tyr	Asp
3555			
Cys	Thr	Pro	Arg
3570			
Gly	Arg	Cys	Ile
3585			
Cys	Ala	Asp	Gly
3600			

Ser	Asp	Glu	Lys	Asp	Cys	Thr	Pro	Arg	Cys	Asp	Met	Asp	Gln	Phe
3605						3610					3615			
Gln	Cys	Lys	Ser	Gly	His	Cys	Ile	Pro	Leu	Arg	Trp	Arg	Cys	Asp
3620						3625					3630			
Ala	Asp	Ala	Asp	Cys	Met	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Glu	Ala	Cys	Gly
3635						3640					3645			
Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Cys	Pro	Leu	Asp	Glu	Phe	Gln	Cys	Asn	Asn
3650						3655					3660			
Thr	Leu	Cys	Lys	Pro	Leu	Ala	Trp	Lys	Cys	Asp	Gly	Glu	Asp	Asp
3665						3670					3675			
Cys	Gly	Asp	Asn	Ser	Asp	Glu	Asn	Pro	Glu	Glu	Cys	Ala	Arg	Phe
3680						3685					3690			
Val	Cys	Pro	Pro	Asn	Arg	Pro	Phe	Arg	Cys	Lys	Asn	Asp	Arg	Val
3695						3700					3705			
Cys	Leu	Trp	Ile	Gly	Arg	Gln	Cys	Asp	Gly	Thr	Asp	Asn	Cys	Gly
3710						3715					3720			
Asp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Asp	Cys	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	His	Thr
3725						3730					3735			
Thr	His	Cys	Lys	Asp	Lys	Lys	Glu	Phe	Leu	Cys	Arg	Asn	Gln	Arg
3740						3745					3750			
Cys	Leu	Ser	Ser	Ser	Leu	Arg	Cys	Asn	Met	Phe	Asp	Asp	Cys	Gly
3755						3760					3765			
Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Glu	Asp	Cys	Ser	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Thr
3770						3775					3780			
Ser	Cys	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser	Ile	Cys	Gly	Asp	Glu	Ala	Arg	Cys
3785						3790					3795			
Val	Arg	Thr	Glu	Lys	Ala	Ala	Tyr	Cys	Ala	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe
3800						3805					3810			
His	Thr	Val	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys
3815						3820					3825			
Leu	Arg	Phe	Gly	Thr	Cys	Ser	Gln	Leu	Cys	Asn	Asn	Thr	Lys	Gly
3830						3835					3840			

Gly	His	Leu	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Asn	Phe	Met	Lys	Thr	His	Asn
3845						3850					3855			
Thr	Cys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Glu	Tyr	Gln	Val	Leu	Tyr	Ile	Ala
3860						3865					3870			
Asp	Asp	Asn	Glu	Ile	Arg	Ser	Leu	Phe	Pro	Gly	His	Pro	His	Ser
3875						3880					3885			
Ala	Tyr	Glu	Gln	Ala	Phe	Gln	Gly	Asp	Glu	Ser	Val	Arg	Ile	Asp
3890						3895					3900			
Ala	Met	Asp	Val	His	Val	Lys	Ala	Gly	Arg	Val	Tyr	Trp	Thr	Asn
3905						3910					3915			
Trp	His	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala
3920						3925					3930			
Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Asn	Arg	His	Arg	Arg	Gln	Ile	Asp	Arg	Gly
3935						3940					3945			
Val	Thr	His	Leu	Asn	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Met	Pro	Arg	Gly	Ile
3950						3955					3960			
Ala	Ile	Asp	Trp	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ser	Gly
3965						3970					3975			
Arg	Asp	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Gln	Met	Lys	Gly	Glu	Asn	Arg	Lys
3980						3985					3990			
Thr	Leu	Ile	Ser	Gly	Met	Ile	Asp	Glu	Pro	His	Ala	Ile	Val	Val
3995						4000					4005			
Asp	Pro	Leu	Arg	Gly	Thr	Met	Tyr	Trp	Ser	Asp	Trp	Gly	Asn	His
4010						4015					4020			
Pro	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Ala	Met	Asp	Gly	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr
4025						4030					4035			
Leu	Val	Gln	Asp	Asn	Ile	Gln	Trp	Pro	Thr	Gly	Leu	Ala	Val	Asp
4040						4045					4050			
Tyr	His	Asn	Glu	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp	Ala	Lys	Leu	Ser	Val
4055						4060					4065			
Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Ala	Ala

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

Ser	Gly	Tyr	Cys	Glu	Asn	Phe	Gly	Thr	Cys	Gln	Met	Ala	Ala	Asp
4310						4315					4320			
Gly	Ser	Arg	Gln	Cys	Arg	Cys	Thr	Ala	Tyr	Phe	Glu	Gly	Ser	Arg
4325						4330					4335			
Cys	Glu	Val	Asn	Lys	Cys	Ser	Arg	Cys	Leu	Glu	Gly	Ala	Cys	Val
4340						4345					4350			
Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Gly	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Cys	Thr	Asp	Gly
4355						4360					4365			
Arg	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Leu	Thr	Cys	Val	Gly	His	Cys	Ser	Asn
4370						4375					4380			
Gly	Gly	Ser	Cys	Thr	Met	Asn	Ser	Lys	Met	Met	Pro	Glu	Cys	Gln
4385						4390					4395			
Cys	Pro	Pro	His	Met	Thr	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Glu	His	Val	Phe
4400						4405					4410			
Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gly	His	Ile	Ala	Ser	Ile	Leu	Ile	Pro	Leu
4415						4420					4425			
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Val	Phe	Trp
4430						4435					4440			
Tyr	Lys	Arg	Arg	Val	Gln	Gly	Ala	Lys	Gly	Phe	Gln	His	Gln	Arg
4445						4450					4455			
Met	Thr	Asn	Gly	Ala	Met	Asn	Val	Glu	Ile	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr
4460						4465					4470			
Lys	Met	Tyr	Glu	Gly	Gly	Glu	Pro	Asp	Asp	Val	Gly	Gly	Leu	Leu
4475						4480					4485			
Asp	Ala	Asp	Phe	Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Lys	Pro	Thr	Asn	Phe	Thr
4490						4495					4500			
Asn	Pro	Val	Tyr	Ala	Thr	Leu	Tyr	Met	Gly	Gly	His	Gly	Ser	Arg
4505						4510					4515			
His	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Leu	Gly	Arg
4520						4525					4530			
Gly	Pro	Glu	Asp	Glu	Ile	Gly	Asp	Pro	Leu	Ala				
4535						4540								

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

<400> 11
 gcuggcgggcg gccgcccagg gccgggggccc gcgcgccagc cugagccccgc cccgcccggc 60
 agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcgggcggc 120
 gcggcgggcg cgggggcagc ggcaaccccg gcgcgcgggc aaggacucgg agggcugaga 180
 cgcggcgggc gcggcgcggg gagcgcgggg gcgcggcgcc ggagccccgg gcccgccaug 240
 ggcucccccc agccggggccc ucuccggcuu cuggcgcgucg ugcugcugcu gcugcugcug 300
 cugcugcugc agcuccagca ucuuugcgcg gcagcgcguc auccgcugcu cggcgggcaa 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 agguugugucc ugcagagaag cugagcugug gaccaccag ccacaagugu 660
 guaccugccu cguggcgcguc cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720
 ggcugugcua ccuugugcgc cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc 780
 gccguguuuc ugugcgacgg cgacgacgac uguggugacg gcagcgauga gcgcggcugu 840
 gcagacccgg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcgggc gcgauggcgg cggcgccugc 900
 aucccgagc gcuggggucg cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca 960
 gccgagcucu gcggccgucc gggccccggg gccacguccg cggccggcg 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 gcgcgucguc acacaucugc acugaccuca agauuggcuu ugaugcacg 1320
 ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag 1380
 gacccagaug ccugcagcca gaucuguguc aaauacaagg gcuauuuuaa gugugagugc 1440
 uacccugggcu acgagaugga ccuacugacc aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc 1500
 ccaucccuua ucuuacacaa ccggcacgag gugcgaggga ucgaccuggu gaagcggaac 1560
 uauucacgcc ucauccccau gcucaagaau gucguggcac uagaugugga aguugccacc 1620
 aaucgcaucu acugguuguga ccucuccuac cguaagauca auagcgccua cauggacaag 1680

gccagugacc	cgaaagagca	ggagguccuc	auugacgagc	aguugcacuc	uccagagggc	1740
cuggcagugg	acugggucca	caagcacauc	uacuggacug	acucgggcaa	uaagaccauc	1800
ucaguggcca	caguugaugg	uggccgccga	cgcacucucu	ucagccguaa	ccucagugaa	1860
ccccggggcca	ucgcuguuga	ccccucgca	ggguucaugu	auuggucuga	cuggggggac	1920
caggccaaga	uugagaaauc	ugggcucaac	gguguggacc	ggcaaacacu	ggugucagac	1980
aaauuugaau	ggcccaacgg	aaucacccug	gaucugcuga	gccagcgcuu	guacugggua	2040
gacuccaagc	uacaccaacu	guccagcauu	gacuucagug	gaggcaacag	aaagacgcug	2100
aucuccucca	cugacuuccu	gagccacccu	uuuggggaug	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	aagagcccc	2520
gggaccaccg	uccacagauc	caccuaccag	aaccacagca	cagagacacc	aagccugaca	2580
gcugcagucc	caagcucagu	uagugucucc	agggcuccca	gcaucagccc	gucuacccua	2640
agcccugcaa	ccagcaacca	cucccagcac	uaugcaaaug	aagacaguua	gaugggcuca	2700
acagucacug	ccgcuguuau	cgggaucauc	gugcccacau	uggugauagc	ccuccugugc	2760
augaguggau	accugaucug	gagaaaacugg	aagcgggaag	acaccaaaag	caugaauuuu	2820
gacaacccag	ucuaacaggaa	aacaacagaa	gaagaagacg	aagaugagcu	ccauauaggg	2880
agaacugcuc	agaauggcca	ugucuauccu	gcagcaauca	gcagcuuuga	ucgcccacug	2940
ugggcagagc	ccugucuuug	ggagaccaga	gaaccgggaag	acccagcccc	ugcccucaag	3000
gagcuuuuug	ucuugccggg	ggaaccaagg	ucacagcugc	accaacuccc	gaagaacccu	3060
cuuuccgagc	ugccugucgu	caaauccaag	cagugggcau	uaagccuuga	agaugaugga	3120
cuacccugag	gaugggauca	ccccuucgu	gccucaugga	auucaguccc	augcacuaca	3180
cucuggaugg	uguauagacug	gaugaauggg	uuucuaauua	ugggucugug	ugaguguaug	3240
ugugugugug	auuuuuuuuu	uaauuuuau	uugcggaaag	guaaccacaa	aguuaugaug	3300
aacugcaaac	auccaaagga	ugugagaguu	uuucuaugua	uaauguuuuu	uacacuuuuu	3360
aacugguugc	acuacccaug	aggaauucgu	ggaauggcuu	cugcugacua	acaugaugca	3420
cauaacccaa	uggggggcca	uggcacagua	ccuacucacu	cauuuaaaaa	cuauauuuac	3480
agaagauguu	ugguugcugg	gggggcuuuu	uuagguuuug	gggcuuuugu	uuuuuguaaa	3540
uaagaugauu	augcuuugug	gcuauccauc	aacauaagua	aaaaaaaaaa	aaaaacacuu	3600

caacuccuc	ccccauuag	auuauuuau	aacauuuu	aaaaaucaga	ugaguucua	3660
aaauauuu	gagaagugag	aguauuuau	uuuggcaugu	uuggcccacc	acacagacuc	3720
ugugugugua	uguguguguu	uauaugugua	ugugugugac	agaaaaaucu	guagagaaga	3780
ggcacauca	uggcuacugu	ucaaaacau	aaagauaaau	uuuuuuucac	acaguccaca	3840
agggguauau	cuuguguuu	ucagaaaagc	cuuuggaaau	cuggaucaga	aaauagauac	3900
caugguuugu	gcauuuugu	aguaaaaaag	gcaaaucuuu	ucaccucugg	cuauuccuga	3960
gaccccagga	agucaggaaa	agccuuucag	cucacccaug	gcugcuguga	cuccuaccag	4020
ggcuuucuu	gcuuuggcga	aggucagugu	acagacauuc	caugguacca	gagugcucag	4080
aaacucaaga	uaggauaugc	cucaccucca	gcuaucuccu	guuuuaaagu	ucagcucuuu	4140
gaguaacuuc	uucauuuuc	uucaggacac	uuggguugaa	uucaguaagu	uuccucugaa	4200
gcaccucgaa	gggugccauc	cuuacagagc	uaaguggaga	cguuuccaga	ucagcccaag	4260
uuuacuauag	agacuggccc	aggcacugaa	ugucuaggac	augcugugga	ugaagauaaa	4320
gaugguggaa	uagguuuuau	cacauucuu	auuucucuuu	uccccuuacu	cucuaccuuu	4380
uccuuuauug	ggggaaacau	uuuaagguaa	uaauuagguu	acuuaccuac	auauguucuu	4440
auagaugaaa	cuauuuuug	gcuaaaguca	gaacaacugg	ccaaaauuga	agucuuuuu	4500
gaggggggaa	auggcuaucg	caauuuuau	uuauuugga	uauuuuuguu	cacacaggaa	4560
uuugguuuac	ugcuuuguaa	auaaaaggaa	aaacuccggg	uauauguaa	gauguucuu	4620
auuauagaca	ucuuucuuuc	uuuucuuugc	cuugggggag	gaaggagaa	gugcucuuuu	4680
cuacuugugg	ggucucccau	uggaaacaua	auccuauagu	cccagaagga	uucagucucc	4740
aguggcuuuc	ccauccaaag	agaaagaguu	ugaguuuucuu	aacucugcug	uucugccacu	4800
uacucccacu	agacaaccag	ggacaaggug	caacauaggaa	guguuugacu	uaaguaggag	4860
cagaggagcu	gcaucuaaau	ucaucauacc	uggaacuuga	cacacuuuag	caauugccuu	4920
cccaucccu	ccugccagau	gcccccaacu	caaugaaguu	ggaugucua	ccagcuugau	4980
acccuuugaa	uuuucaguca	gacauucugg	aguucuaagc	uccuguaccu	aggaccuucc	5040
ucugugucac	ucuuuggccuc	cuaaacucua	agaaaauaac	uauuuucugg	agcuugggca	5100
guguguuuug	cauaauccag	caaucuccuc	augacaugca	uguguugaua	guccugaaac	5160
auucauugag	aggguaaaug	caguugaccu	agaauagcca	auaccuaaca	gaauuuuag	5220
aacagguggc	caacuccuau	ggagcuuacu	cacauuuuac	uauuuuuua	agaacggaaa	5280
guaaaauuau	uuuugacuga	agaaaaauga	ugacagugaa	aaacauggaa	auguacucua	5340
aacaagugac	uuuuucugua	accuuccaaa	gaaacugaau	uuuccaagga	auuaauugau	5400
aacaguggcu	aaggcauagu	uucuaaacuu	ucaguaagau	ccuggcauuc	acagaaaaaa	5460

augaugaauug	gggucuggac	auacagccug	agaucucaaa	augacaauga	aaucacaaac	5520
uuuuucucag	agacauucau	guuuccugca	uauugcuacaa	cugcaguuug	aaagaggcag	5580
caauggggagc	aacccuuuac	aagaaacaaa	uugugauaua	uucauguguu	ggacggcagu	5640
aaauaagaug	aaaccugagg	agucagauc	accuuccccc	auucauagag	gcuuuucagc	5700
cucuuuuuga	ggucacaguu	cauauuuuu	gccuuuugcc	cccugucuaa	gcuaucuaa	5760
gccaaucaca	gaucacagag	ucacuggacu	auagagcugg	aaggaagcuc	agagacaaug	5820
ccaaggggggc	agaaaauuua	ucagaagcca	guccagugc	guuuccucca	uuuccuucug	5880
caggaagacu	auuuuugggc	gccugaacau	uguaucuaac	cugcuaccua	uacuaugguc	5940
uaccuuuccu	ccaguggaau	uacaaaggca	cuaacugaaa	ugccuucua	aaacagagaa	6000
aacgaaacug	uacuuuuua	cucuugauac	acagauuuu	uauaaaacag	auugaaguua	6060
ccuguuuacu	ggcaaaaaga	gaugagauc	ggauuuuuu	guauggcagu	aaguccuauu	6120
gaucuccucca	guuauucucag	uauagucgca	guauuuucau	ucacuaaaac	cacucacuag	6180
auaccaacua	cacaccuggc	acugcagaug	uaaaggucag	ucacacaugu	ucugacuuaa	6240
cagaguucac	aguagcagug	gaggauaua	uauugggaaa	caaaaaaggc	auugauucua	6300
uucagagcac	uguuagggcu	caaaggagag	aggggucuuu	ccaccuaaga	aaugaggaau	6360
agggucacua	uagaagugac	cuaaagucuu	aaaauuuaag	aaggggaauu	caagcugcuu	6420
cagacagaga	cacaucgagc	uaaaacacag	agguaugaaa	gagcacaggg	acuuuaggaa	6480
uugcacaguu	cauucuaaca	ggaacaaaag	gcucaagggg	ggcaagaaau	gaggcugua	6540
ggaaagagau	ucaauguaag	cacuuuauaa	aaauaguuua	uuucugauuc	aaugaagcau	6600
uucuuugauc	uuguguacaa	ggcacuacau	gcaucaugga	aaauucaua	ggaugcauug	6660
ccagcacuuu	gcagaacuga	uauuauucag	ccucaagcuu	uccaguggcc	aaagggaaa	6720
gcugacugcu	uuucauauau	uugagucaaa	gauuuuuuu	auggucaaug	aagacuaaua	6780
uaagggcagu	gggaauuuca	cagaugcaug	ccauguuguc	gagagccucu	uagauuuucu	6840
caacugugag	aaagaaaaac	gaaaauugug	aagacguuga	gucuggagag	gggaucuaa	6900
ucacugucca	guugggcacu	ggugggaaug	gggaauggc	acaggaaugc	aagccucucc	6960
accuacccc	ccgaacucca	gccauacacu	caucguuuca	caaaauauaa	augaguuaagc	7020
auuaaauguu	ucagaguuaa	uaauuccuuu	ucccgaaaug	caugaagaua	gaguaacaga	7080
cuucucacac	uguaauuuua	ggguauaggag	aaauuagaag	guuaaagaau	uacugcuuca	7140
auuuuucagu	uaaaaaaaaa	ucaggaagcu	cuguucauuc	aggcuauuca	ccaugugcac	7200
agucaagaau	uagcagaaac	ccucugcauu	uacaaacacu	uugugcuaua	aaaaagaaau	7260
uuuuuuuuu	ccacgugugu	gugugugua	auauauauau	auauauauau	uuuaagccaa	7320
gguuuuugau	cuuuuuuaca	aaaacuacaa	gagaaaacaa	auauaccugu	ccaaaccaua	7380

ES 2 765 573 T3

uacuuuuaaa agagcauuuu uuuuuccaaua caagcuguug uuaauuuggg gguaaagugc 7440
 ugauuugcaa acuuucauaa auuguuucca aguggauucu ccuuguuugu ccccccuac 7500
 caaccccaaa guuaccauau uugauguaag aaucaggcau guuagaauugu ugugucacac 7560
 uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau ucaaguuccg uuagcuucug uacgcggugc 7620
 ccuuugcagu cuggugucuc uuccagagggc gagggggcug aggauggggu gcugcaucuc 7680
 acuagcuaua cuggcaucau cuugguaaac ugaaaaccaa auguggacau uuguaaaauc 7740
 agugcacugu uucuagagag agauuuuuu cauuuuuuu 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

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		
gcuggcgggcg gccgcccagg gccggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgcccggc	60	
agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcgggcggc agcgggcggc	120	
gcggcgggcg cgggggcagc ggcaaccccc gcgcccgggc aaggacucgg agggcugaga	180	
cgcgggcggc gcggcgcggg gagcgcggg cgcgggcgcc ggagccccgg gcccgccaug	240	
ggccuccccc agccggggccc ucuccggcuu cuggcgucugc ugcugcugcu gcugcugcug	300	
cugcugcugc agcuccagca ucuuugcgcg gcagcggcug auccgcugcu cggcgggcaa	360	
gggcccggcca aggauugcga aaaggaccaa uccagugcc ggaacgagcg cugcaucccc	420	
ucugugugga gaugcgacga ggacgaugac ugcuuagacc acagcgacga ggacgacugc	480	
cccaagaaga ccugugcaga cagugacuuc accugugaca acggccacug cauccacgaa	540	
cgguuggaagu gugacggcga ggaggagugu ccugauggcu ccgaugaguc cgaggccacu	600	
ugcaccaagc agguugucc ugcagagaag cugagcugug gaccaccag ccacaagugu	660	
guaccugccu cguggcgucg cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc	720	
ggcugugcua ccuggcgaa cgagugucug cacaacaau gcggcugcuc acacaucugc	780	
acugaccuca agauuggcuu ugaaugcacg ugcccagcag gcuuccagcu ccuggaccag	840	
aagaccugug gcgacauuga ugagugcaag gaccagaug ccugcagcca gaucuguguc	900	
aaauacaagg gcuauuuuaa gugugagugc uaccuggc uacgagaugga ccuacugacc	960	
aagaacugca aggcugcugc uggcaagagc ccaucccuua ucuucaccaa ccggcacgag	1020	
gugcgaggga ucgaccuggu gaagcggaac uauucacgcc ucauccccau gcucaagaau	1080	
gucguggcac uagaugugga aguugccacc aaucgcaucu acugguguga ccucuccuac	1140	
cguaagaucu auagcgccua cauggacaag gccagugacc cgaaagagca ggagguccuc	1200	
auugacgagc aguugcacuc uccagagggc cuggcagugg acugggucca caagcacau	1260	

uacuggacug	acucgggcaa	uaagaccauc	ucaguggcca	caguugaugg	uggccgccga	1320
cgcacucucu	ucagccguua	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	cgaggccauu	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	gucuaccua	agcccugcaa	ccagcaacca	cucccagcac	2160
uaucaaaug	aagacaguua	gaugggcuca	acagucacug	ccgcuguuau	cgggaucauc	2220
gugcccauag	uggugauagc	ccuccugugc	augaguggau	accugaucug	gagaaacugg	2280
aagcgggaaga	acaccaaaaag	caugaauuuu	gacaacccag	ucuacaggaa	aacaacagaa	2340
gaagaagacg	aagaugagcu	ccauauaggg	agaacugcuc	agauuggcca	ugucuauccu	2400
gcagcaauca	gcagcuuuga	ucgcccacug	ugggcagagc	ccugucuuug	ggagaccaga	2460
gaaccggaag	accagccccc	ugcccucaag	gagcuuuuug	ucuugccggg	ggaaccaagg	2520
ucacagcugc	accaacuccc	gaagaacccu	cuuuccgagc	ugccugucgu	caaauccaag	2580
cagugggcau	uaagccuuga	agaugaugga	cuaccucugag	gaugggauca	ccccuucgu	2640
gccucaugga	auucaguccc	augcacuaca	cucuggaugg	uguauagacug	gaugaauugg	2700
uuucuauaua	ugggucugug	ugaguguaug	ugugugugug	auuuuuuuuu	uaauuuuau	2760
uugcggaaaag	guaaccacaa	aguuaugaug	aacugcaaac	auccaaagga	ugugagaguu	2820
uuucuaugua	uaauguuuuu	uacacuuuuu	aacugguugc	acuaccacug	aggaauucgu	2880
ggaauggcua	cugcugacua	acaugaugca	cauaacccaa	uggggggccaa	uggcacagua	2940
ccuuacucau	cauuuaaaaa	cuauauuuac	agaagauguu	ugguugcugg	gggggcuuuu	3000
uuagguuuug	gggcauuugu	uuuuuguaaa	uaagaugauu	augcuuugug	gcuauccauc	3060
aacauaagua	aaaaaaaaaa	aaaaacacuu	caacucccuc	ccccauuuag	auuauuuuuu	3120
aacauauuuu	aaaaaucaga	ugaguucuaa	aaauaauuuu	gagaagugag	aguauuuuuu	3180

uuugggcaugu	uuggcccacc	acacagacuc	ugugugugua	uguguguguu	uauaugugua	3240
ugugugugac	agaaaaaucu	guagagaaga	ggcacaucua	uggcuacugu	ucaaaauacau	3300
aaagauaaa	uuuuuuucac	acaguccaca	agggguauau	cuuguaguuu	ucagaaaagc	3360
cuuuggaaa	cuggaucaga	aaauagauac	caugguuugu	gcauuuau	aguaaaaag	3420
gcaaaucuuu	ucaccucugg	cuauuccuga	gaccccagga	agucaggaaa	agccuuucag	3480
cucacccaug	gcugcuguga	cuccuaccag	ggcuuuucug	gcuuuggcga	aggucagugu	3540
acagacauuc	caugguacca	gagugcucag	aaacucaaga	uaggauaugc	cucacccuca	3600
gcuacuccuu	guuuuaaagu	ucagcucuuu	gaguaacuuc	ucaaauuuc	uucaggacac	3660
uuggguugaa	uucaguaagu	uuccucugaa	gcaccucugaa	gggugccauc	cuuacagagc	3720
uaaguggaga	cguuuccaga	ucagcccaag	uuuacuauag	agacuggccc	aggcacugaa	3780
ugucuaggac	augcugugga	ugaagauaaa	gaugguggaa	uaggguuuau	cacaucucuu	3840
auuucucuuu	uccccuuacu	cucuaccuuu	uccuuuau	ggggaaacau	uuuaagguaa	3900
uaauuagguu	acuuaccauc	auauguucuu	auagaugaaa	cuauuuuuug	gcuuuaguca	3960
gaacaacugg	ccaaaauuga	agucuuuuu	gaggggggaa	auggcuuacg	cauuuuuaua	4020
uuauauugga	uauuuauugu	cacacaggaa	uuugguuuac	ugcuuuguaa	auaaaaggaa	4080
aaacuccggg	uauauguaua	gauguucuu	auuauagaca	ucuuuuuugc	uuuuuuggc	4140
cuugggggag	gaaggagaga	gugcucuuuu	cuacuugugg	ggucucccau	uggaaaacaua	4200
auccuuuagu	cccagaagga	uucaguuccc	aguggcuuuc	ccauccaaag	agaaagaguu	4260
ugaguuuuu	aacucugcug	uucugccacu	uacucccacu	agacaaccag	ggacaaggug	4320
caacauggaa	guguuugacu	uaaguaggag	cagaggagcu	gcaucuaa	ucaucauacc	4380
uggaacuuga	cacacuuuag	caaaugccuu	cccaucccuu	ccugccagau	gcccccaacu	4440
caaugaaguu	ggaugucuca	ccagcuugau	accuuuugaa	uuuucaguca	gacauucugg	4500
aguucuaaga	uccuguaccu	aggaccuucc	ucugugucac	ucuuuggccuc	cuaaaacucua	4560
agaaaauaac	uauauucugg	agcuugggca	guguguuuug	cauaauccag	caauucuccuc	4620
augacaugca	uguguugaua	guccugaaac	auucauugag	aggguaaaug	caguugaccu	4680
agaauagacca	auaccaaaca	gaauuuuag	aacagguggc	caacuccuau	ggagcuuacu	4740
cacauuuuac	uauuuuuuua	agaacggaaa	guaaaauuau	uuuugacuga	agaaaaauga	4800
ugacagugaa	aaacauggaa	auguacucua	aacaagugac	uuuuucugua	accuuccaaa	4860
gaaacugaau	uuuccaagga	auuaaaugau	aacaguggcu	aaggcauagu	uucuaaacuu	4920
ucaguaagau	ccuggcauuc	acagaaaaaa	augaugaauug	gggucuggac	auacagccug	4980
agaucuaaaa	augacaauga	aaucacaaac	uuuuucucag	agacauucau	guuuccugca	5040

uauugcuacaa	cugcaguuug	aaagaggcag	caauggggagc	aaccuuuac	aagaaacaaa	5100
uugugauaua	uucauguguu	ggacggcagu	aaauaagaug	aaaccugagg	agucagaucc	5160
accuuccccc	auucauagag	gcuuuucagc	cucauuuuga	gguacaguua	cauauuuuu	5220
gccuuuugcc	cccgugcaua	gcuauucuaca	gccaaucaca	gaucacagag	ucacuggacu	5280
auagagcugg	aaggaagcuc	agagacaaug	ccaagggggc	agaaaauua	ucagaagcca	5340
guccagugc	guuuccucca	uuuccuucug	caggaagacu	auuuugggcu	gccugaacau	5400
uguaucaaa	cugcuaccua	uacuaugguc	uaccuuuccu	ccaguggaau	uacaaaggca	5460
cuaacugaaa	ugccuucua	aaacagagaa	aacgaaacug	uacuuauua	cucuugauac	5520
acagauuauu	uauaaaacag	auugaaguaa	ccuguuuacu	ggcaaaaaga	gaaugagauc	5580
ggauuuuuuu	guauugcagu	aaguccuauu	gauccucca	guuauucag	uauagacugca	5640
guauauucau	ucacuaaaa	cacucacuag	auaccaacua	cacaccuggc	acugcagaug	5700
uaaaggucag	ucacacaugu	ucugacuua	cagaguucac	aguagcagug	gaggauaua	5760
uauugggaaa	caaaaaaggc	auugauucua	uucagagcac	uguuagggcu	caaaggagag	5820
aggggucuuu	ccaccuaaga	aaugaggaau	agggucauca	uagaagugac	cuuaagucuu	5880
aaaaauuaag	aaggggaauu	caagcugcuu	cagacagaga	cacaucgagc	uaaaacacag	5940
agguaugaaa	gagcacaggg	acuuuaggaa	uugcacaguu	cauucuaaca	ggaacaaaag	6000
gcucaagggg	ggcaagaaau	gaggcugua	ggaaagagau	ucaauguaag	cacuuuauaa	6060
aaauagauua	uuucugauuc	aaugaagcau	uucuugauca	uuguguacaa	ggcacuacau	6120
gcaucaugga	aaauucaua	ggaugcauug	ccagcacuuu	gcagaacuga	uauuauucag	6180
ccucaagcuu	uccaguggcc	aaagggaaau	gcugacugcu	uuucauauau	uugagucaaa	6240
gauuuuuuuu	auuggucaug	aagacuaaua	uaagggcagu	gggaauuuca	cagaugcaug	6300
ccauguuguc	gagagccucu	uagauuuucu	caacugugag	aaagaaaaac	gaaaauugug	6360
aagacguuga	gucuggagag	gggauacuaa	ucacugucca	guugggcacu	ggugggaaug	6420
gggaaauagg	acaggaauuc	aagccucucc	acccuacccc	ccgaacucca	gccauacacu	6480
caucguuua	caaaaauuaa	augaguuaag	auuaaauguu	ucagaguuaa	uaauuccuuu	6540
ucccgaaaug	caugaagaua	gaguaacaga	cuucucacac	uguauuuuuu	ggguauaggag	6600
aaauuagaag	guuaaagaau	uacugcuuca	auuuuucagu	uaaaaaaaaa	ucaggaagcu	6660
cuguucauuc	aggcuauuca	ccaugugcac	agucaagaau	uagcagaaac	ccucugcauu	6720
uacaaacacu	uugugcuaua	aaaaaguaau	uuuuaaaaag	ccacgugugu	gugugugua	6780
auauauauau	auauauauau	uuaaagccaa	gguuuugua	cuuuuuuaca	aaaacuacaa	6840
gagaaaacaa	auauaccugu	ccaaaccuaa	uacuuuuaaa	agagcauuuu	uuuuuccaua	6900
caagcuguug	uuauuuuggg	gguaaagugc	ugauuugcaa	acuucacuaa	auuguuccca	6960

ES 2 765 573 T3

```

aguggauucu ccuuguuugu cucccccuac caaccccaaa guuaccauau uugauguaag 7020
aaucaggcau guuagaangu ugugucacac uaacugauuc ugcucuuuuu gucuugucau 7080
ucaaguuccg uuagcuucug uacgcgggugc ccuungcagu cuggugucuc uuccagaggc 7140
gagggggcug aggaugggggu 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	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	560
Met Lys Arg Cys Tyr Arg Ala Pro Gln	Ser Thr Ser 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	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
gcuggcgccg gccgcccagg gccggggccg cgcgccccagc cugagcccgc cccgcccgcg 60
agcgucaccg aaccugcuug aaugcagcc gagagccgg gccggcgccg agcgccggcg 120
gcggcgccgg cgggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga 180
cgcgccggcg gcggcgccgg gagcgccggg cgcggcgccg ggagccccgg gcccgccaug 240
ggccuccccg agccggggcc ucuccggcuu cuggcgccgc ugcugcugcu gcugcugcug 300
cugcugcugc agcuccagca ucucggcg gcagcgccug auccgcugcu cggcgcccaa 360
gggccggcca aggauugcga aaaggaccaa uccagugcc 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 agguugugucc ugacagagaag cugagcugug gacccaccag ccacaagugu 660
guaccugccu cgugggcgug cgacggggag aaggacugcg aggguggagc ggaugaggcc 720
ggcugugcua ccucacuggg caccugccgu ggggacgagu uccagugugg ggaugggaca 780

uguguccuug	caaucaagca	cugcaaccag	gagcaggacu	guccagaugg	gagugaugaa	840
gcuggcugcc	uacaggggcu	gaacgagugu	cugcacaaca	auggcggcug	cucacacauc	900
ugcacugacc	ucaagauugg	cuuugaauug	acgugcccag	caggcuucca	gcuccuggac	960
cagaagaccu	guggcgacau	ugaugagugc	aaggacccag	augccugcag	ccagaucugu	1020
gucaauuaca	agggcuauuu	uaagugugag	ugcuaccucg	gcuacgagau	ggaccuacug	1080
accaagaacu	gcaaggcugc	ugcuggcaag	agcccauucc	uaauucucac	caaccggcac	1140
gaggugcgga	ggaucgaccu	ggugaagcgg	aacuaauucac	gccucauucc	caugcucaag	1200
aaugucgugg	cacuagaugu	ggaaguugcc	accaauucga	ucuaucuggug	ugaccucucc	1260
uaccguaaga	ucuaugcgc	cuacauggac	aaggccagug	acccgaaaga	gcaggaggucc	1320
cucauugacg	agcaguugca	cucuccagag	ggccuggcag	uggacugggu	ccacaagcac	1380
aucuacugga	cugacucggg	caauaagacc	aucucagugg	ccacaguuga	uggugggccg	1440
cgacgcacuc	ucuuacgccc	uaaccucagu	gaaccccggg	ccaucgcugu	ugacccccug	1500
cgagggguuca	uguauugguc	ugacuggggg	gaccaggcca	agauugagaa	aucugggcuc	1560
aacggugugg	accggcaaac	acugguugca	gacaauauug	aauggcccaa	cggaauccac	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	acauugucdu	cuuccaugag	cugaagcagc	caagagcucc	agaugccugu	1920
gagcugagug	uccagccuaa	uggaggcugu	gaauaccugu	gccuuccugc	uccucagauc	1980
uccagccacu	cucccaagua	cacauugcc	uguccugaca	caauguggcu	ggguccagac	2040
augaagaggu	gcuaccgaga	ugcaaaugaa	gacaguaaga	ugggcucaac	agucacugcc	2100
gcuguuauccg	ggaucaucgu	gcccauagug	gugauagccc	uccugugcau	gaguggauac	2160
cugaucugga	gaaacuggaa	gcggaagaac	acaaaagca	ugaauuuuga	caaccaguc	2220
uacaggaaaa	caacagaaga	agaagacgaa	gaugagcucc	auauagggag	aacugcucag	2280
auuggccaug	ucuaucucg	acgaguggca	uuagccuug	aagaugaugg	acuaccucga	2340
ggaugggauc	acccccuucg	ugccucaugg	aaucagucc	caugcacuac	acucuggaug	2400
guguaugacu	ggaugaaugg	guuucuaau	augggucugu	gugagugua	gugugugugu	2460
gauuuuuuu	uuaaaauuu	guugcgga	gguaaccaca	aaguuuugau	gaacugcaaa	2520
cauccaaagg	augugagagu	uuuucuaugu	auaauguuuu	auacacuuuu	uaacugguug	2580
cacuaccuau	gaggaauucg	uggaauggcu	acugcugacu	aacaugaugc	acauaaccaa	2640

auggggggcca	auggcacagu	accuuacuca	ucauuuaaaa	acuaauuuua	cagaagaugu	2700
uugguugcug	ggggggcuuu	uuuagguuuu	ggggcauuug	uuuuuuuguaa	auaagaugau	2760
uaugcuuuugu	ggcuauccau	caacauaagu	aaaaaaaaaa	aaaaaacacu	ucaacuuccu	2820
cccccauuua	gauuaauuuu	uaacauauuu	uaaaaaucag	augaguucua	uaaauaauuu	2880
agagaaguga	gaguauuuau	uuuuggcaug	uuuugggccac	cacacagacu	cugugugugu	2940
augugugugu	uuauaugugu	auguguguga	cagaaaaauc	uguagagaag	aggcacauuc	3000
auggcuaucg	uucaaaauca	uaaagauaaa	uuuauuuuca	cacaguccac	aagggguaua	3060
ucuuguagu	uucagaaaag	ccuuuggaaa	ucuggaucag	aaaauagaua	ccaugguuug	3120
ugcaauuaug	uaguaaaaaa	ggcaaaucuu	uucaccucug	gcuaauuccug	agaccccagg	3180
aagucaggaa	aagccuuuca	gcucacccau	ggcugcugug	acuccuacca	gggcuuucuu	3240
ggcuuuggcg	aaggucagug	uacagacauu	ccaugguacc	agagugcuca	gaaacucaag	3300
auaggauaug	ccucaccccuc	agcuacuccu	uguuuuuaag	uucagcucuu	ugaguaacuu	3360
cuucaauuuc	uuucaggaca	cuugggguuga	auucaguaag	uuuccucuga	agcaccucga	3420
agguggccau	ccuuacagag	cuaaguggag	acguuuccag	aucagcccaa	guuuacuaua	3480
gagacuggcc	caggcacuga	augucuagga	caugcugugg	augaagauaa	agauggugga	3540
auagguuuua	ucacaucucu	uauuucucuu	uuccccuuac	ucucuaccu	uuccuuuau	3600
uggggaaaca	uuuuuaggua	auaaaauaggu	uacuuaccu	cauauuguca	uauagaugaa	3660
acuaauuuuu	ggcuuaaguc	agaacaacug	gccaaaauug	aagucauauu	ugagggggga	3720
aauggcauac	gcaauauuuu	auuauauugg	auauuuuugu	ucacacagga	auuugguuuu	3780
cugcuuuugua	aauaaaagga	aaaacuccgg	guauauguau	agauguucuu	cauuauagac	3840
aucuucuuug	cuuuucuuug	ccuuggggga	ggaaggagga	agugcucuuu	ucuacuugug	3900
gggucuccca	uuggaaacau	aauccuauag	ucccagaagg	auucaguccc	caguggcuuu	3960
cccauccaaa	gagaaagagu	uugaguuuuc	uaacucugcu	guucugccac	uuacucccac	4020
uagacaacca	gggacaaggu	gcaacaugga	aguguuugac	uuuagguaga	gcagaggagc	4080
ugcaucuaau	cucaucauac	cuggaacuug	acacacuuua	gcaaaugccu	ucccaucccu	4140
accugccaga	ugcccccaac	ucaauagaagu	uggaugucuc	accagcuuga	uacccuuuga	4200
auuuucaguc	agacaauucug	gaguucuaagc	auccuguacc	uaggaccuuc	cucuguguca	4260
cucuuggccu	ccuaaacucu	aagaaaauaa	cuauauucug	gagcuugggc	aguguguuuu	4320
gcauaaucca	gcaauccucc	caugacaugc	auguguugau	aguuccugaaa	cauucuuuga	4380
gaggguaaa	gcaguugacc	uagaauagacc	aaauaccaaac	agaauuuuaa	gaacaggugg	4440
ccaacuccua	uggagcuuac	ucacauauua	cuauucuuuu	aagaacggaa	aguaaaaaua	4500
uuuuugacug	aagaaaaaug	augacaguga	aaaacaugga	aauguacuca	aaacaaguga	4560

cuuuuucugu	aaccuuccaa	agaaacugaa	uuuuccaagg	aaauaaauga	uaacaguggc	4620
uaaggcauag	uuucuaaaacu	uucaguaaga	uccuggcauu	cacagaaaaa	aaugaugaau	4680
ggggucugga	cauacagccu	gagaucucaa	aaugacaaug	aaauucacaa	cuuuuucuca	4740
gagacauuca	uguuuccugc	auaugcuaca	acugcaguuu	gaaagaggca	gcaaugggag	4800
caaccuuua	caagaaacaa	auugugauau	auucaugugu	uggacggcag	uaaaauaagau	4860
gaaaccugag	gagucagauc	caccuucucc	cauucauaga	ggcuuuucag	ccucauuuuug	4920
agguacaguu	acauaucuuu	ugccuuuugc	ccccgugcau	agcuauucuac	agccaauccac	4980
agaucacaga	gucacuggac	uauagagcug	gaaggaagcu	cagagacaa	gccaaagggg	5040
cagaaaauuu	aucagaagcc	agucccagug	cguuuccucc	auuuccuucu	gcaggaagac	5100
uaauuugggc	ugccugaaca	uuguaucaaa	ccugcuaccu	auacuauggu	cuaccuuucc	5160
uccaguggaa	uuacaaaggc	acuaacugaa	augccuucua	gaaacagaga	aaacgaaacu	5220
guacuuaauu	acucuuguaa	cacagauuau	uuauaaaaca	gauugaagua	accuguuaac	5280
uggcaaaaag	agaauagagau	cggauuuaaa	uguauggcag	uaaguccuau	ugaucccucc	5340
aguuaucuca	guaugacugc	aguauauuca	uucacuaaaa	ccacucacua	gauaccaacu	5400
acacaccugg	cacugcagau	guaaaggua	gucacacaug	uucugacuuu	acagaguuca	5460
caguagcagu	ggagggaugau	auauguggaa	acaaaaaagg	cauugauucu	auucagagca	5520
cuguuagggc	ucaaaggaga	gaggggucuu	uccaccuaag	aaaugaggaa	uagggucauc	5580
auagaaguga	ccuaagucu	uaaaaauuua	gaaggggguu	ccaagcugcu	ucagacagag	5640
acacaucgag	cuaaaacaca	gagguaugaa	agagcacagg	gacuuuagga	auugcacagu	5700
ucauucuaac	aggaacaaaa	ggcucaagg	gggcaagaaa	ugaggcugua	uggaaagaga	5760
uucaauguaa	gcacuuuuaa	aaauagauua	auuucugauu	caaugaagca	uuucuuugauc	5820
auuguguaca	aggcacuaca	ugcaucaugg	aaaauucauu	aggauugcau	gccagcacuu	5880
ugcagaacug	auauuuuua	gccucaagcu	uuccaguggc	caaagggaaa	ugcugacugc	5940
uuuucauua	uuugagucua	agaauuuuuu	uauggucaau	gaagacuaau	auaagggcag	6000
ugggauuuuc	acagaugcau	gccauuguu	cagagagccuc	uuagaauuuu	ucaacuguga	6060
gaaagaaaaa	cgaauauguu	gaagacguug	agucuggaga	ggggauacua	aucacugucc	6120
aguugggcac	uggugggaau	ggggaaaugg	cacaggaaug	caagccucuc	caccuaccc	6180
cccgaacucc	agccauacac	ucaucguuuc	acaaaauuaa	aaugaguua	cauuaaaugu	6240
uucagaguua	auaaauccuu	uucccgaaa	gcaugaagau	agaguaaacag	acuuucacac	6300
cuguauuuuu	aggguaugga	gaauuuagaa	gguaaaagaa	uuacugcuuc	aaauuuucag	6360
uuaaaaaaaa	aucaggaagc	ucuguucauu	caggcuauug	accaugugca	cagucaagaa	6420

```

uuagcagaaa cccucugcau uuacaaacac uuugugcuau aaaaaaguaa uuuuuuuuuuuu 6480
gccacgugug ugugugugua uauauauaua uauauauaua uuuaaagcca agguuuugau 6540
acuuuuuuuac aaaaacuaca agagaaaaca aaauuaccug uccaaaccuau auacuuuuuuuu 6600
aagagcauuu uuuuuuuccau acaagcuguu guuaauuugg ggguaaagug cugauuugca 6660
aacuucauca aaauuguucc aaguggauuc uccuuguuug ucucuccua ccaaccccaa 6720
aguuaccaua uuugauguaa gaucaggca uguuagaauu uugugucaca cuaacugauu 6780
cugcucuuuu ugucuuuga uucaaguucc guuagcuucu guacgaggug ccuuuugcag 6840
ucuggugucu cuuccagagg cgagggggcu gaggaugggg ugucugcauc cacuagcuau 6900
acuggcauca ucuugguaaa cugaaaacca aauguggaca uuuguuuuuu cagugcacug 6960
uuucuagaga gagauuuuuu ucauuuuuuu aaaa 6994

```

<210> 16
 <211> 700
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

Met Gly Leu Pro Glu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln His Leu Ala Ala Ala
20          25          30

Ala Ala Asp Pro Leu Leu Gly Gly Gln Gly Pro Ala Lys Asp Cys Glu
35          40          45

Lys Asp Gln Phe Gln Cys Arg Asn Glu Arg Cys Ile Pro Ser Val Trp
50          55          60

Arg Cys Asp Glu Asp Asp Asp Cys Leu Asp His Ser Asp Glu Asp Asp
65          70          75          80

Cys Pro Lys Lys Thr Cys Ala Asp Ser Asp Phe Thr Cys Asp Asn Gly
85          90          95

His Cys Ile His Glu Arg Trp Lys Cys Asp Gly Glu Glu Glu Cys Pro
100         105         110

Asp Gly Ser Asp Glu Ser Glu Ala Thr Cys Thr Lys Gln Val Cys Pro
115         120         125

Ala Glu Lys Leu Ser Cys Gly Pro Thr Ser His Lys Cys Val Pro Ala
130         135         140

```

Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Lys Asp Cys Glu Gly Gly Ala Asp Glu
 145 150 155 160
 Ala Gly Cys Ala Thr Ser Leu Gly Thr Cys Arg Gly Asp Glu Phe Gln
 165 170 175
 Cys Gly Asp Gly Thr Cys Val Leu Ala Ile Lys His Cys Asn Gln Glu
 180 185 190
 Gln Asp Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Gln Gly Leu
 195 200 205
 Asn Glu Cys Leu His Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Thr Asp
 210 215 220
 Leu Lys Ile Gly Phe Glu Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Gln Leu Leu
 225 230 235 240
 Asp Gln Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Pro Asp Ala
 245 250 255
 Cys Ser Gln Ile Cys Val Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Lys Cys Glu Cys
 260 265 270
 Tyr Pro Gly Tyr Glu Met Asp Leu Leu Thr Lys Asn Cys Lys Ala Ala
 275 280 285
 Ala Gly Lys Ser Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg
 290 295 300
 Arg Ile Asp Leu Val Lys Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ile Pro Met Leu
 305 310 315 320
 Lys Asn Val Val Ala Leu Asp Val Glu Val Ala Thr Asn Arg Ile Tyr
 325 330 335
 Trp Cys Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Ala Tyr Met Asp Lys
 340 345 350
 Ala Ser Asp Pro Lys Glu Gln Glu Val Leu Ile Asp Glu Gln Leu His
 355 360 365
 Ser Pro Glu Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Lys His Ile Tyr Trp
 370 375 380
 Thr Asp Ser Gly Asn Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Val Asp Gly Gly
 385 390 395 400

Arg Arg Arg Thr Leu Phe Ser Arg Asn Leu Ser Glu Pro Arg Ala Ile
 405 410 415
 Ala Val Asp Pro Leu Arg Gly Phe Met Tyr Trp Ser Asp Trp Gly Asp
 420 425 430
 Gln Ala Lys Ile Glu Lys Ser Gly Leu Asn Gly Val Asp Arg Gln Thr
 435 440 445
 Leu Val Ser Asp Asn Ile Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu
 450 455 460
 Leu Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys Leu His Gln Leu Ser
 465 470 475 480
 Ser Ile Asp Phe Ser Gly Gly Asn Arg Lys Thr Leu Ile Ser Ser Thr
 485 490 495
 Asp Phe Leu Ser His Pro Phe Gly Ile Ala Val Phe Glu Asp Lys Val
 500 505 510
 Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu
 515 520 525
 Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala Glu Asn Leu Asn Asn Pro His
 530 535 540
 Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys Gln Pro Arg Ala Pro Asp Ala
 545 550 555 560
 Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu
 565 570 575
 Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ala Cys
 580 585 590
 Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp Met Lys Arg Cys Tyr Arg Asp
 595 600 605
 Ala Asn Glu Asp Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala Val Ile
 610 615 620
 Gly Ile Ile Val Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met Ser Gly
 625 630 635 640
 Tyr Leu Ile Trp Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser Met Asn

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						
gcugggcggcg gccgcccagg gccgggggccg cgcgcccagc cugagcccgc cccgccgccc						60
agcgucaccg aaccugcuug aaaugcagcc gaggagccgg ggcggggcggc agcggcgggcg						120
gcggcgggcg cggggggcagc ggcaaccccg gcgccgcggc aaggacucgg agggcugaga						180
cgcgcgggcg gcggcgcggg gagcgcgggg cgcggcgggc ggagccccgg gcccgccaug						240
ggccuccccg agccggggccc ucuccggcuu cuggcgcguc ucugcugcu gcugcugcug						300
cugcugcugc agcuccagca ucuugcgggc gcagcgcguc auccgcugcu cggcgggccaa						360
gggcccgcca 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 ugacagagaag cugagcugug gaccaccag ccacaagugu						660
guaccugccu cguggcgcu cgcgggggag aaggacugcg aggguggagc ggauagggcc						720
ggcugugcua ccuugugcg cccgcacgag uuccagugcg gcaaccgcuc gugccuggcc						780
gccguguucg ugugcgacgg cgacgacgac uguggugacg gcagcgaua gcgcggcugu						840
gcagacccgg ccugcgggcc ccgcgaguuc cgcugcgggc gcgauggcgg cggcgccugc						900
aucccgagc gcugggucug cgaccgccag uuugacugcg aggaccgcuc ggacgaggca						960
gccgagcucu gcggccgucc gggccccggg gccacguccg cggccgccgc cugcgccacc						1020
gccucccagu ucgccugccg cagcgggcag ucgugcacc ugggcuuggc cugcgacggc						1080
gaccgcgacu gcaaagacaa aucggacgag gccgacugcc cacugggcac cugccguggg						1140
gacgaguucc agugugggga ugggacaugu guccuugcaa ucaagcacug caaccaggag						1200
caggacuguc cagaugggag ugaugaagcu ggcugccuac aggggcugaa cgagugucug						1260

cacaacaauug	gcggcugcuc	acacaucugc	acugaccuca	agauuggcuu	ugaaugcacg	1320
ugcccagcag	gcuuccagcu	ccuggaccag	aagaccugug	gcgacauuga	ugagugcaag	1380
gaccagaug	ccugcagcca	gaucuguguc	aaauacaagg	gcuauuuuaa	gugugagugc	1440
uaccucggcu	acgagaugga	ccuacugacc	aagaacugca	aggcugcugc	uggcaagagc	1500
ccaucuccuaa	ucuucaccaa	ccggcacgag	gugcggaggga	ucgaccuggu	gaagcggaac	1560
uauucacgcc	ucauccccau	gcucaagaau	gucguggcac	uagaugugga	aguugccacc	1620
aaucgcaucu	acugguguga	ccucuccuac	cguaagaucu	auagcgccua	cauggacaag	1680
gccagugacc	cgaaagagca	ggagguccuc	auugacgagc	aguugcacuc	uccagagggc	1740
cuggcagugg	acugggucca	caagcacauc	uacuggacug	acucgggcaa	uaagaccauc	1800
ucaguggcca	caguugaugg	uggccgccga	cgcacucucu	ucagccguaa	ccucagugaa	1860
ccccgggcca	ucgcuguuga	cccccugcga	ggguucaugu	auuggucuga	cuggggggac	1920
caggccaaga	uugagaauc	ugggcucaac	gguguggacc	ggcaaacacu	ggugucagac	1980
aaauugaau	ggcccaacgg	aaucaccucg	gaucugcuga	gccagcgcuu	guacugggua	2040
gacuccaagc	uacaccaacu	guccagcauu	gacuucagug	gaggcaacag	aaagacgcug	2100
aucuccucca	cugacuuccu	gagccacccu	uuuggggaug	cuguguuuga	ggacaaggug	2160
uucuggacag	accuggagaa	cgaggccauu	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	aagagccccc	2520
gggaccaccg	uccacagauc	caccuaccag	aaccacagca	cagagacacc	aagccugaca	2580
gcugcagucc	caagcucagu	uagugucccc	agggcuccca	gcaucagccc	gucuaccuaa	2640
agcccugcaa	ccagcaacca	cucccagcac	uaugcaaaug	aagacaguua	gaugggcuca	2700
acagucacug	ccgcuguuau	cgggaucauc	gugcccuaug	uggugauagc	ccuccugugc	2760
augaguggau	accugaucug	gagaaacugg	aagcgggaaga	acaccaaaaag	caugaauuuu	2820
gacaacccag	ucuacaggaa	aacaacagaa	gaagaagacg	aagauagagc	ccaauaaggg	2880
agaacugcuc	agauuggcca	ugucuauccu	gcacgagugg	cauuuagccu	ugaagaugau	2940
ggacuacccu	gaggauaggga	ucacccccuu	cgugccucau	ggauuucagu	cccaugcacu	3000
acacucugga	ugguguauga	cuggaugaau	ggguuucua	auaugggucu	gugugagugu	3060
augugugugu	gugaauuuuu	uuuuuuuuu	auguugcgga	aagguaacca	caaaguuaug	3120
augaacugca	aacauccaaa	ggaugugaga	guuuuucua	guauaauguu	uuauacacuu	3180

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	cucccccauu	uagaauauuu	auuaacauau	uuuaaaaauc	agaugaguuc	3480
uauaaaauau	uuagagaagu	gagaguauuu	auuuuuggca	uguuuugccc	accacacaga	3540
cucugugugu	guaugugugu	guuuauaugu	guaugugugu	gacagaaaaa	ucuguagaga	3600
agaggcacau	cuauggcuac	uguucaaaua	cauaaagaua	aauuuauuuu	cacacagucc	3660
acaaggggua	uaucuuguag	uuuucagaaa	agccuuugga	aaucuggauc	agaaaauaga	3720
uaccaugguu	ugugcaauua	uguaguaaaa	aaggcaaauc	uuuucaccuc	uggcuauucc	3780
ugagacccca	ggaagucagg	aaaagccuuu	cagcucaccc	auggcugcug	ugacuccuac	3840
cagggcuuuc	uuggcuuugg	cgaaggucag	uguacagaca	uuccauggua	ccagagugcu	3900
cagaaacuca	agauaggaua	ugccucaccc	ucagcuacuc	cuuguuuuua	aguucagcuc	3960
uuugaguaac	uucuucaauu	ucuuucagga	cacuuggguu	gaauucagua	aguuuccucu	4020
gaagcacccu	gaagggugcc	auccuuacag	agcuaaugug	agacguuucc	agaucagccc	4080
aaguuuacua	uagagacugg	cccaggcacu	gaauugcuag	gacaugcugu	ggaugaagau	4140
aaagauggug	gaauaggguu	uaucauauu	cuuauuucuc	uuuuccccc	acucucuacc	4200
auuuccuuua	uguggggaaa	cauuuuuag	uaauaaaau	guuacuuacc	aucauauuu	4260
cauauagaug	aaacuaauuu	uuggcuuaag	ucagaacaac	uggccaaaau	ugaagucua	4320
uuugaggggg	gaaauggcau	acgcaauauu	auauuauauu	ggauauuuau	guucacacag	4380
gaauuugggu	uacugcuuug	uaaaauaaa	gaaaaaacucc	ggguauauug	auagauguuc	4440
uucuuauuag	acauuuucuu	ugcuuuucuu	ggccuugggg	gaggaaggga	gaagugcucu	4500
uuucuaauug	ugggggucucc	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	cacucuuugc	cuccuaaaacu	cuaagaaaau	aacuauauuc	uggagcuugg	4920
gcaguguguu	uugcauaauc	cagcaaucuc	cucaugacau	gcauguguug	auaguccuga	4980
aaauuacuu	gagaggguaa	augcaguuga	ccuagaaua	ccaauaccaa	acagaauuuu	5040

aagaacaggu	ggccaacucc	uauggagcuu	acucacauau	uacuaucuu	uuaagaacgg	5100
aaaguaaaau	uauuuuugac	ugaagaaaaa	ugaugacagu	gaaaaacaug	gaaauuguacu	5160
caaaacaagu	gacuuuuucu	guaaccuucc	aaagaaacug	aauuuuccaa	ggaauuaaaau	5220
gauaacagug	gcuaaggcau	aguuuuuaaa	cuuucaguaa	gauccuggca	uucacagaaa	5280
aaaauauga	auggggucug	gacauacagc	cugagaucuc	aaaauagaca	ugaaaauucac	5340
aacuuuuucu	cagagacauu	cauguuuccu	gcuaugcua	caacugcagu	uugaaagagg	5400
cagcaauggg	agcaaccuuu	uacaagaaac	aaauugugau	auauucaugu	guuggacggc	5460
aguaaaauaag	augaaaccug	aggagucaga	uccaccuucc	cccauucuaa	gaggcuuuuc	5520
agccucauuu	ugagguacag	uuacauaucu	uuugccuuuu	gcccccgugc	auagcuauuc	5580
acagccaauc	acagaucaca	gagucacugg	acuauagagc	uggaagggaag	cucagagaca	5640
augccaaggg	ggcagaaaau	uuaucagaag	ccagucccag	ugcguuuccu	ccauuuuccu	5700
cugcaggaag	acuauuuugg	gcugccugaa	cauuguauc	aaaccugcuac	cuauacuaug	5760
gucuaccuuu	ccuccagugg	aaauacaaag	gcacuaacug	aaaugccuuc	uagaaacaga	5820
gaaaacgaaa	cuguacuauu	uuacucuuu	uacacagauu	auuuauaaaa	cagauugaag	5880
uaaccuguaa	acuggcaaaa	agagaauag	aucggauuuu	aauguauggc	aguaaguccu	5940
auugaucccu	ccaguuauuc	caguaugacu	gcaguaauuu	cauucacuaa	aaccacucac	6000
uagauacca	cuacacaccu	ggcacugcag	auguaaaggu	cagucacaca	uguucugacu	6060
uuacagaguu	cacaguagca	guggaggaug	auauaugugg	aaacaaaaaa	ggcauugauu	6120
cuauucagag	cacuguuagg	gcucaaagga	gagagggguc	uuuccaccua	agaaaugagg	6180
aaauaggguca	ucauagaagu	gaccuuuaag	cuuaaaaaau	aaagaaggga	uuccaagcug	6240
cuucagacag	agacacaucg	agcuaaaaca	cagagguauu	aaagagcaca	gggacuuuag	6300
gaauugcaca	guucauucua	acaggaacaa	aaggcucaag	gggggcaaga	aaugaggcug	6360
uauggaaaga	gauucaauug	aagcacuuu	uaaaauagau	uaauuucuga	uucaaugaag	6420
cauuucuuu	ucauugugua	caaggcacua	caugcaucau	ggaaaauuca	uuaggauuca	6480
uugccagcac	uuugcagaac	ugauauuuu	cagccucaa	cuuuccagug	gccaaaggga	6540
aaugcugacu	gcuuuucua	uaauugaguc	aaagauuuu	uaauugguca	augaagacua	6600
auauaagggc	agugggauuu	ucacagaugc	augccauguu	gucgagagcc	ucuuagauuu	6660
ucucaacugu	gagaaagaaa	aacgaaaau	uugaagacgu	ugagucugga	gaggggauac	6720
uaaucacugu	ccaguugggc	acugguggga	auggggaaau	ggcacaggga	ugcaagccuc	6780
uccaccuac	ccccgaacu	ccagccauac	acucaucguu	ucacaaaaua	uaauagaguu	6840
agcauuuuu	guuucagagu	aaauaaaucc	uuuucccga	augcaugaag	auagaguaac	6900
agacuucua	cacuguuuu	uuaggguuag	gagaauuuag	aagguaaaag	aaauacugcu	6960

ucaauuuuuc aguuaaaaaa aaaucaaggaa gcucuguuua uucagggcuau gcaccaugug 7020
cacagucaag aaauagcaga aaccucucugc auuuacaaac acuuugugcu auaaaaaagu 7080
aaauuuuuaa aagccacgug ugugugugug uauauauaua uauauauaua uauuuaaagc 7140
caagguuuug auacuuuuuu acaaaaacua caagagaaaa caaaauauacc uguccaaacc 7200
auauacuuiu aaaagagcau uuuuuuuucc auacaagcug uuguuaauuu ggggguaaag 7260
ugcugauuug caaacuucan caaaauuguuc ccaaguggau ucuccuuguu ugucucuccc 7320
uaccaacccc aaaguuacca uauuugaugu aagaaucagg cauguuagaa uguuguguca 7380
cacuaacuga uucugcucuu uuugucuuugu 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			

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

Val Phe Trp Thr Asp Leu Glu Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg
 645 650 655
 Leu Asn Gly Leu Glu Ile Ser Ile Leu Ala Glu Asn Leu Asn Asn Pro
 660 665 670
 His Asp Ile Val Ile Phe His Glu Leu Lys Gln Pro Arg Ala Pro Asp
 675 680 685
 Ala Cys Glu Leu Ser Val Gln Pro Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys
 690 695 700
 Leu Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ala
 705 710 715 720
 Cys Pro Asp Thr Met Trp Leu Gly Pro Asp Met Lys Arg Cys Tyr Arg
 725 730 735
 Ala Pro Gln Ser Thr Ser Thr Thr Thr Leu Ala Ser Thr Met Thr Arg
 740 745 750
 Thr Val Pro Ala Thr Thr Arg Ala Pro Gly Thr Thr Val His Arg Ser
 755 760 765
 Thr Tyr Gln Asn His Ser Thr Glu Thr Pro Ser Leu Thr Ala Ala Val
 770 775 780
 Pro Ser Ser Val Ser Val Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Pro Ser Thr
 785 790 795 800
 Leu Ser Pro Ala Thr Ser Asn His Ser Gln His Tyr Ala Asn Glu Asp
 805 810 815
 Ser Lys Met Gly Ser Thr Val Thr Ala Ala Val Ile Gly Ile Ile Val
 820 825 830
 Pro Ile Val Val Ile Ala Leu Leu Cys Met Ser Gly Tyr Leu Ile Trp
 835 840 845
 Arg Asn Trp Lys Arg Lys Asn Thr Lys Ser Met Asn Phe Asp Asn Pro
 850 855 860
 Val Tyr Arg Lys Thr Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Leu His Ile
 865 870 875 880
 Gly Arg Thr Ala Gln Ile Gly His Val Tyr Pro Ala Arg Val Ala Leu

885

890

895

Ser Leu Glu Asp Asp Gly Leu Pro
900

<210> 19
<211> 2358
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 19

aaacucacac aacaacucuu ccccgugag aggagacagc cagugcgacu ccaccucca	60
gcugcagcggc agccgccccg gccgacagcc ccgagacgac agcccgccgc gucccggucc	120
ccaccuccga ccaccgccag cgcuccaggc cccgcccgcuc cccgcucgcc gccaccgcgc	180
ccuccgcucc gcccgagug ccaaccauga ccgcccagcag uaugggcccc gucccgugcg	240
ccuucguggu ccuccucgcc cucugcagcc ggccggccgu cggccagaac ugcagcgggc	300
cgugccggug cccggacgag ccggcgccgc gcugcccgcc gggcgugagc cucgugcugg	360
acggcgucgg cucgucgccg gucugcgcca agcagcuggg cgagcugugc accgagcgcg	420
accccgucga cccgcacaag ggccucucuu gugacuucgg cccccggcc aaccgcaaga	480
ucggcgugug caccgccaaa gauggugcuc ccugcaucuu cggugguacg guguaaccga	540
gcggagaguc cuuccagagc agcugcaagu accagugcac gugccuggac gggcguggg	600
gcugcaugcc ccugugcagc auggacguuc gucugcccag ccugacugc ccuucccca	660
ggagggucua gcugcccggg aaugcugcg aggagugggg gugugacgag cccaaggacc	720
aaaccguggu ugggcccugcc cucgcgccuu accgacugga agacacguuu ggcccagacc	780
caacuaugau uagagccaac ugccuggucc agaccacaga guggagcgcc uguuccaaga	840
ccugugggau gggcaucucc acccgguua ccaaugacaa cgcuccugc aggcuaagaga	900
agcagagccg ccugugcaug gucaggccuu gcgaagcuga ccuggaagag aacauuaaga	960
agggcaaaaa gugcauccgu acucccaaaa ucuccaagcc uaucaaguu gagcuuucug	1020
gcugcaccag caugaagaca uaccgagcua aaucugugg aguauguacc gacggccgau	1080
gcugcaccac ccacagaacc accaccugc cgguggaguu caagugcccu gacggcgagg	1140
ucaugaagaa gaacaugaug uucaucaaga ccugugccug ccuuuacaac ugucgggag	1200
acaugacau cuuugaaucg cuguacuaca ggaagaugua cggagacaug gcaugaagcc	1260
agagagugag agacauuaac ucauagacu ggaacuuga cugauucaca ucucuuuuu	1320
ccguaaaaau gauuucagua gcacaaguua uuuuuuucug uuuuuuuaac ugggggaaaa	1380
gauucccacc caauuacaaa cauugugcca ugucaacaa auagucuauc aaccccagac	1440
acugguuuga agaanguuaa gacuugacag uggaacuaca uuaguacaca gcaccagaau	1500

guauauuaag gugugggcuu aggagcagug ggagggguacc agcagaaagg uuaguaucan	1560
cagauagcau cuuauacgag uaaauagccu gcuauuugaa guguaauuga gaaggaaaau	1620
uuuagcgugc ucacugaccu gccuguagcc ccagugacag cuaggauugc cauucuccag	1680
ccaucaagag acugagucan guuguuccuu aagucagAAC agcagacucan gcucugacau	1740
ucugauucga augacacugu ucaggaaucg gaauccuguc gauuagacug gacagcuugu	1800
ggcaagugaa uuugccugua acaagccaga uuuuuuaaaa uuuaauuugu aaauauugug	1860
ugugugugug uguguguaa uauauauaua uguacaguua ucuaaguuaa uuuaaaguug	1920
uuugugccuu uuuaauuuug uuuuuaaugc uuugauuuu caauguuagc cucaauuuu	1980
gaacaccaua gguagaauu aaagcuuguc ugaucguuca aagcaugaaa uggauacuua	2040
uauggaaaau cugcucagau agaauagacag uccgucaaaa cagauuguuu gcaaagggga	2100
ggcaucagug uccuuggcag gcugauuuu agguaggaaa ugugguagcc ucacuuuuua	2160
ugaacaaaug gccuuuauua aaaacugagu gacucuaau agcugaucag uuuuuucacc	2220
uggaagcauu uguuuucuacu uugauaugac uguuuuucgg acaguuuuu uguugagagu	2280
gugacaaaa guuacauguu ugcaccuuuc uaguugaaaa uaaaguguau auuuuuucua	2340
uaaaaaaaaa aaaaaaaaa	2358

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

<400> 20

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val Leu
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro
20 25 30

Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
35 40 45

Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
50 55 60

Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
65 70 75 80

Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser

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

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 21

aggaaggagg	ggugggccuga	ccccucggca	guccuccccc	ucagccuuuc	cccaauugc	60
uacuucucug	gggucuccagg	uccugcuugu	gcucagcucc	agcucacugg	cuggccaccg	120
agacuucugg	acaggaaacu	gcaccauccu	cuucucccag	caagggggcu	ccagagacug	180
cccacccagg	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
cugcaaggga	uucuuccgcc	gcagcgucan	caagggagcg	cacuacaucu	gccacagugg	660
cggccacugc	cccagggaca	ccuacaugcg	ucgcaagugc	caggaguguc	ggcuucgcaa	720
augccgucag	gcuggcaugc	gggaggagug	uguccuguca	gaagaacaga	uccgccugaa	780
gaaacugaag	cggcaagagg	aggaacaggc	ucaugccaca	uccuugcccc	ccagggcuuu	840
cucaccccc	caaauccugc	cccagcucag	cccggaaaca	cuggggcauga	ucgagaagcu	900
cugcgcugcc	cagcaacagu	guaaccggcg	cuccuuuuu	gaccggcuuc	gagucacgcc	960
uuggcccaug	gcaccagauc	cccuaagccg	ggaggcccg	cagcagcgcu	uugcccacuu	1020
cacugagcug	gccaucgucu	cugugcagga	gauaguugac	uuugcuaaac	agcuaccgg	1080
cuuccugcag	cucagccggg	aggaccagau	ugcccugcug	aagaccucug	cgaucgaggu	1140
gaugcuucug	gagacaucuc	ggagguacaa	cccugggagu	gagagauuca	ccuuccucaa	1200
ggauuucagu	uauaaccggg	aagacuunuc	caaagcagg	cugcaagugg	aaaucaucaa	1260
ccccaucuuc	gaguucucca	gggccaugaa	ugagcugcaa	cuccaauaug	ccgaguunuc	1320
cuugcucauu	gcuaucagca	ucuuucucug	agaccggccc	aacgugcagg	accagcucca	1380
gguagagagg	cugcagcaca	cauauugga	agcccugcau	gccuacgucu	ccauccacca	1440
uccccaugac	cgacugaugu	ucccacggau	gcuaauaaaa	cuggugagcc	uccggacccu	1500
gagcagcguc	cacucagagc	aaguguuugc	acugcgucug	caggacaaaa	agcucccacc	1560
gcugcucucu	gagaucuggg	augugcacga	augacuguu	uguccccaau	uuuucuguuu	1620
ucuuaggccg	auggcugagg	ccugguggcu	gccuccuaga	aguggaacag	acugagaagg	1680
gcaaacauuc	cugggagcug	ggcaaggaga	uccucccgug	gcuuuuuag	agagucuuag	1740

ES 2 765 573 T3

```

gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga      1800
agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cugggggcca cuuugcacag gguucuccag      1860
agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuuccc 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

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

<400> 23
 aggaaggagg ggugggccuga cccucggca guccuccccc ucagccuuuc cccaaaauugc 60
 uacuucucug gggcuccagg uccugcuugu gcucagcucc agcucacugg cuggccaccg 120
 agacuucugg acaggaaacu gcaccauccu cuucucccag caagggggcu ccagagacug 180
 cccaccacagg aagucuggug gccuggggau uuggacagug ccuugguaau gaccagggcu 240
 ccagggaagag auguccuugu ggcugggggc cccugugccu gacauuccuc cugacucugc 300
 gguggagcug uggaagccag gcgcacagga ugcaagcagc caggcccagg gaggcagcag 360
 cugcauccuc agagaggaag ccaggaucc ccacucugcu ggggguaucg cagggguggg 420
 gcuggagggcu gcagagccca cagcccugcu caccagggca gagccccuu cagaaccac 480
 agagaucugu ccacaaaagc ggaaaaaggg gccagcccc aaaaugcugg ggaacgagcu 540
 augcagcug uguggggaca aggccucggg cuuccacuac aauguucuga gcugcgaggg 600
 cugcaaggga uucuccgccc gcagcgucac caagggagcg cacuacauu gccacagugg 660
 cggccacugc cccauggaca ccuacaugcg ucgcaagugc caggaguguc ggcuccgcaa 720
 augccgucag gcuggcaugc gggaggagug uguccuguca gaagaacaga uccgccugaa 780
 gaaacugaag cggcaagagg aggaacaggc ucaugccaca uccuugcccc ccagggcucc 840
 cucaccccc caaauccugc cccagcucag cccggaacaa cugggcauga ucgagaagcu 900
 cgucgcugcc cagcaacagu guaaccggcg cuccuuuucu gaccggcuuc gagucacggg 960
 gaugcuucug gagacaucuc ggagguacaa cccugggagu gagaguauc ccuuccucaa 1020
 ggauuucagu uauaaccggg aagacuugc caaagcaggg cugcaagugg aaaucauca 1080
 ccccaucuu gaguuccuca 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
 gagcagcugc cacucagagc aaguguuugc acugcgucug caggacaaaa agcuccacc 1380
 gcugcucucu gagaucuggg augugcacga augacuguuc uguccccaua uuuucuguuu 1440
 ucuuggccgg auggcugagg ccugguggcg gccuccuaga aguggaacag acugagaagg 1500
 gcaaacauuc cugggagcug ggcaaggaga uccucccgug gcauuaaaag agagucaaag 1560
 gguugcgagu uuuguggcua cugagcagug gagcccucgc uaacacugug cugugucuga 1620

ES 2 765 573 T3

```

agaucaugcu gaccccacaa acggaugggc cuggggggcca cuuugcacag gguucuccag      1680
agcccugccc auccugccuc caccacuucc uguuuuuuccc 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 ccagccccc aauugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu	360
guggggacaa gggcucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau	420
ucuuccgccc cagcgucauc aaggggagcgc acuaacucug ccacaguggc ggccacugcc	480
ccauggacac cuacaugcgu cgcaagugcc aggagugucg gcuucgcaaa ugccgucagg	540
cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc	600
ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc caggggcuucc ucaccccccc	660
aaauccugcc ccagcucagc ccggaacaac ugggcaugau cgagaagcuc gucgugccc	720
agcaacagug uaaccggcgc uccuuuucug accggcuucg agucacgccu ugcccacagg	780
caccagaucc ccuagccgg gagggccguc agcagcgcuu ugcccacuu acugagcugg	840
ccaucgucuc ugugcaggag auaguugacu uugcuaaaca gcuaaccggc uuccugcagc	900
ucagccggga ggaccagauu gcccugcuga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg	960
agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu	1020
auaaccggga agacuugcc aaagcagggc ugcaauggga auucaucaac ccaucuucg	1080
aguucuccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguugcc uugcucauug	1140
cuaucagcau cuucucugca gaccggccca acgugcagga ccagcuccag guagagaggc	1200
ugcagcacac auauguggaa gcccugcaug ccuacgucuc cauccaccu ccccaugacc	1260
gacugauguu cccacggau 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 gagucaaaag guugcgaguu	1560
uuguggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug	1620
accccacaaa cggauggggc uggggggccac uuugcacagg guucuccaga gcccugccca	1680
uccugccucc accacuuccu guuuuuccca caggggccca agaaaaauuc uccacuguca	1740
aaaaaaaa	1748

<210> 26
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Met Pro His Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala

ES 2 765 573 T3

1	5	10	15
Glu Pro Thr	Ala Leu Leu Thr	Arg Ala Glu Pro Pro	Ser Glu Pro Thr
	20	25	30
Glu Ile Arg	Pro Gln Lys Arg	Lys Lys Gly Pro Ala	Pro Lys Met Leu
	35	40	45
Gly Asn Glu	Leu Cys Ser Val	Cys Gly Asp Lys	Ala Ser Gly Phe His
	50	55	60
Tyr Asn Val	Leu Ser Cys Glu Gly	Cys Lys Gly Phe Phe	Arg Arg Ser
	65	70	75
Val Ile Lys	Gly Ala His Tyr	Ile Cys His Ser Gly	Gly His Cys Pro
	85	90	95
Met Asp Thr	Tyr Met Arg Arg	Lys Cys Gln Glu Cys	Arg Leu Arg Lys
	100	105	110
Cys Arg Gln	Ala Gly Met Arg	Glu Glu Cys Val Leu	Ser Glu Glu Gln
	115	120	125
Ile Arg Leu	Lys Lys Leu Lys	Arg Gln Glu Glu Glu	Gln Ala His Ala
	130	135	140
Thr Ser Leu	Pro Pro Arg Ala	Ser Ser Pro Pro Gln	Ile Leu Pro Gln
	145	150	155
Leu Ser Pro	Glu Gln Leu Gly	Met Ile Glu Lys Leu	Val Ala Ala Gln
	165	170	175
Gln Gln Cys	Asn Arg Arg Ser	Phe Ser Asp Arg Leu	Arg Val Thr Pro
	180	185	190
Trp Pro Met	Ala Pro Asp Pro	His Ser Arg Glu Ala	Arg Gln Gln Arg
	195	200	205
Phe Ala His	Phe Thr Glu Leu	Ala Ile Val Ser Val	Gln Glu Ile Val
	210	215	220
Asp Phe Ala	Lys Gln Leu Pro	Gly Phe Leu Gln Leu	Ser Arg Glu Asp
	225	230	235
Gln Ile Ala	Leu Leu Lys Thr	Ser Ala Ile Glu Val	Met Leu Leu Glu
	245	250	255

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
aggggaagucu uuggugagcc caucucucuu uaccaaggua acgaagcgca gacuccgggc	120
ccgggugggc ggcaucacca ccagguucac gccgagaagg agcuggagga gagccgcccg	180
gcuccagccg gaccgcuugc ccgccaucac cguuguaauc uaugcagcaa acaagcugga	240
acccgcuggg uggcaccugc aagcagccgc ccggacgcac ccacucugcg guggagcugu	300
ggaagccagg cgcacaggau gcaagcagcc agggccaggg aggcagcagc ugcauccuca	360
gagaggaagc caggaugccc cacucugcug gggguacugc aggggugggg cuggaggcug	420
cagagcccac agcccugcuc accagggcag agcccccuc agaaccaca gagaucguc	480
cacaaaagcg gaaaaagggg ccagccccca aaugcuggg gaacgagcua ugcagcgugu	540

guggggacaa ggcucgggc uuccacuaca auguucugag cugcgagggc ugcaagggau 600
 ucuuccgccc cagcgucauc aaggagagcgc acuacaucug ccacaguggc ggccacugcc 660
 ccauggacac cuacaugcgu cgcaagugcc aggagugucg gcuucgcaa ugccgucagg 720
 cuggcaugcg ggaggagugu guccugucag aagaacagau ccgccugaag aaacugaagc 780
 ggcaagagga ggaacaggcu caugccacau ccuugccccc caggggcuucc ucaccccccc 840
 aaauccugcc ccagcucagc ccggaacaac ugggcaugau cgagaagcuc gucgucugccc 900
 agcaacagug uaaccggcgc uccuuuucug accggcuucg agucacgccu uggcccaugg 960
 caccagaucc ccuagccgg gagggccguc agcagcgcuu ugcccacuu acugagcugg 1020
 ccaucgucuc ugugcaggag auaguugacu uugcuaaaca gcuacccggc uuccugcagc 1080
 ucagccggga ggaccagauu gcccugcuga agaccucugc gaucgaggug augcuucugg 1140
 agacaucucg gagguacaac ccugggagug agaguaucac cuuccucaag gauuucaguu 1200
 auaaccggga agacuugcc aaagcagggc ugcaagugga auucaucaac cccaucuuug 1260
 aguucuccag ggccaugaau gagcugcaac ucaaugaugc cgaguugcc uugcucuuug 1320
 cuaucagcau cuucucugca gaccggccca acgugcagga ccagcuccag guagagaggg 1380
 ugcagcacac auauguggaa gcccugcaug ccuacgucuc cauccaccau cccaugacc 1440
 gacugauguu cccacggau cuaaugaaac uggugagccu ccggaccucg agcagcgucc 1500
 acucagagca aguguuugca cugcgucugc aggacaaaaa gcucccaccg cugcucucug 1560
 agaucuggga ugugcacgaa ugacuguucu guccccaauu uuucuguuuu cuuggccgga 1620
 uggcugaggg cugguggcug ccuccuagaa guggaacaga cugagaaggg caaacauucc 1680
 ugggagcugg gcaaggagau ccucccgugg cauuaaaaga gagucaaaagg guugcgaguu 1740
 uuugggcuac ugagcagugg agcccucgcu aacacugugc ugugucugaa gaucaugcug 1800
 accccacaaa cggaugggccc uggggggccac uuugcacagg guucuccaga gccugccca 1860
 uccugccucc accacuuccu guuuuuccca caggggcccca 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

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

275 280 285
 Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met
 290 295 300
 Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly
 325 330 335
 Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met
 340 345 350
 Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile
 355 360 365
 Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val
 370 375 380
 Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser
 385 390 395 400
 Ile His His Pro His Asp Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys
 405 410 415
 Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe
 420 425 430
 Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile
 435 440 445
 Trp Asp Val His Glu
 450

<210> 29
 <211> 2093
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 ucgucaaguu ucacgcuccg cccucuuucc ggacgugacg caagggcggg guugccggaa 60
 gaaguggcga aguacuuuu gaggguaauu gaguagcggc ggugugucag gggcuaaaga 120
 ggaggacgaa gaaaagcaga gcaagggaac ccagggcaac aggaguaguu cacuccgcga 180
 gagggcgucc acgagacccc cgcgcgcagc caugagcccc gcccccgcu guugcuugga 240
 gaggggcggg accuggagag aggcugcucc gugacccac cauguccucu ccuaccacga 300

guucccugga uacccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcgcc ccuucuuuu 360
 caccacug uaaaggaggag gguccggagc cguggcccg ggguccggac ccugaugucc 420
 caggcacuga ugaggccagc ucagccugca gcacagacug ggucauccca gaucccgag 480
 aggaaccaga gcgcaagcga aagaagggcc cagccccgaa gaugcugggc cagcagcuuu 540
 gccugugucug uggggacaag gccuccggcu uccacuacaa cgugcucagc ugcgaaggcu 600
 gcaaggggcuu cuuccggcgc aguguggucc gugguggggc caggcgcuau gccugccggg 660
 guggcggaac cugccagaug gacgcuuuca ugccggcgaa gugccagcag ugccggcugc 720
 gcaagugcaa ggaggcaggg augaggagc agugcguccu uucugaagaa cagaucggga 780
 agaagaagau ucggaacaa cagcagcagg agucacaguc acagucgcag ucaccugugg 840
 ggccgcaggg cagcagcagc ucagccucug ggccuggggc uccccuggu ggaucugagg 900
 caggcagcca gggcuccggg gaaggcgagg guguccagcu aacagcggu caagaacuaa 960
 ugauccagca guugguggcg gcccaacugc agugcaacaa acgcuccuuc uccgaccagc 1020
 ccaaagucac gcccuggccc cugggcgcag acccccaguc ccgagaugcc cgccagcaac 1080
 gcuuugccca cuucacggag cuggccauc uucagucca ggagaucgug gacuucgcu 1140
 agcaagugcc ugguuuccug cagcugggcc gggaggacca gaucgcccuc cugaaggcau 1200
 ccacuaucga gaucagcug cuagagacag ccaggcgcu caaccacgag acagagugua 1260
 ucaccuucuu gaaggacuuc accuacagca aggaagacu ccaccgugca ggccugcagg 1320
 uggaguucuu caaccccauc uucgaguuc cgcgggccau ggcggcgug ggccuggacg 1380
 acgcugagua cgcucugcuc aucgccauc acaucuuuc ggcggaccgg cccaacgugc 1440
 aggagccggg ccgcguggag gcuugcagc agcccuacgu ggaggcgug cuguccuaca 1500
 cgcgcacuaa gaggccgcag gaccagcugc gcuucccgcg caugcucaug aagcugguga 1560
 gccugcgac gcugagcucu ggcacucgg agcaggucuu cgcucugcg cuccaggaca 1620
 agaagcugcc gccucugcug ucggagauu gggacgucca cgagugaggg gcuggccacc 1680
 cagccccaca gccuugccug accaccucc agcagauaga cgcggcacc ccuuccucuu 1740
 ccuagggugg aaggggccc gggccgagc uguagaccua ucggcucua ucccuuggga 1800
 uaagccccag uccaggucca ggaggcucc uccugccca gcgagucuu cagaagggu 1860
 gaaaggguug cagguccga ccacugacc uuccggcug ccuuccucc ccagcuuaca 1920
 ccucaagccc agcacgcagu gcaccuugaa cagagggagg ggaggacca uggcucucc 1980
 ccuagcccg ggagaccagg gccuuccucu uccucugcu uuauuuaua aaaacuaaaa 2040
 acagaaacag gaaaauaaaa uauaauaca auccagccc gagcuggagu 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

<400> 31
 ucgucaaguu ucacgcuccg cccucuuucc ggacgugacg caagggcggg guugccggaa 60
 gaaguggcga aguuacuuuu gaggguaauu gaguagcggc ggugugucag gggcuaaaga 120
 ggaggacgaa gaaaagcaga gcaagggaac ccaggggcaac aggaguaguu cacuccgcga 180
 gagggcgucc acgagacccc cgcgcgcagc caugagcccc gccccccgcu guugcuugga 240
 gagggggcggg accuggagag aggcugcucc gugaccccac cauguccucu ccuaccacga 300
 guucccugga uacccccug ccuggaaaug gccccccuca gccuggcgcc ccuucuuuu 360
 caccacugu aaaggaggag gguccggagc cguggccccg ggguccggac ccugaugucc 420
 caggcacuga ugagggcagc 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 uuggugggcg cccaacugca gugcaacaaa cgcuccuuu 720
 ccgaccagcc caaagucacg ccuuggcccc ugggcgaga ccccagucc cgagaugccc 780
 gccagcaacg cuuugccccc uucacggagc ugcccaucau cucaguccag gagaucgugg 840
 acuucgcuaa gcaagugccu gguuuccugc agcuggggcg ggaggaccag aucgcccucc 900
 ugaaggcauc cacuaucgag aucaugcugc uagagacagc caggcgcuac aaccacgaga 960
 cagagugua u caccuucuu aaggacuua ccuacagcaa ggacgacuuc caccgugcag 1020
 gccugcaggu ggaguucauc aaccccaucu ucgaguucuc gcggggccaug cggcggcugg 1080
 gccuggacga cgcugaguac gccugcuca ucgccaucaa caucuuucug gccgaccggc 1140
 ccaacgugca ggagccgggc cgcgugggag cguugcagca gcccuacgug gaggcgcugc 1200
 uguccuacac gcgcaucaag aggcgcagc accagcugcg cuucccgcg augcucauga 1260
 agcuggugag ccugcgacg cugagcucug ugcacucgga gcaggucuu gccuugcggc 1320
 uccaggacaa gaagcugccg ccucugcugu cggagaucug ggacguccac gagugagggg 1380
 cuggccaccc agccccacag ccuugccuga ccaccucca gcagauagac gccggcaccc 1440
 cuuccucuu cuagggugga aggggcccug ggccgagccu guagaccuau cggcucucau 1500
 cccuugggau aagccccagu ccagguccag gaggcucccu cccugcccag cgagucuucc 1560
 agaaggggug aaaggguuug aggucccgac cacugacccu ucccggcugc ccuccuuccc 1620
 cagcuuacac cucaagccca gcacgcagug caccuugaac agaggggagg gaggaccuau 1680
 ggcucucccc ccuagcccg gagaccagg ccuuccucuu ccucugcuuu uauuuauaa 1740
 aaacuaaaaa cagaaacagg aaaauaaaau augaauacaa uccagcccg 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

His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr Ser Lys
225 230 235 240

Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro Ile
245 250 255

Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp Ala Glu
260 265 270

Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro Asn
275 280 285

Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr Val Glu
290 295 300

Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln Leu Arg
305 310 315 320

Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser Ser
325 330 335

Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Leu
340 345 350

Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
355 360

<210> 33
<211> 71
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 33
gccaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60
auugguuagg c 71

<210> 34
<211> 110
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 34
aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60
ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110

<210> 35
<211> 80
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 35
 cgaggaaugcc gcggcgggga cggcgauugg uccguaugug uggugccacc ggccgcccgc 60
 uccgcccccg 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 cuggccccc au cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60
 acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uaauggugcc agccaucgca 110

<210> 38
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60
 uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110

<210> 39
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gatccgacag tagcctgcac attagtcact tcctgtcagt aaccaatgtg cagactactg 60
 ttttttgaat t 71

<210> 40
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 gatccgccca gtgctcagac taccctgcc tcctgtcag gaacaggtag tctgaacact 60
 ggggtttttga att 73

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

<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

<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 gacctgctca gacagtgtct gcttttt	57
<210> 53 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial	
<220> <223> shADNJA Sintético	
<400> 53 ccgggcgaga agttttaaact 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 ctgagtatt 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	
<400>	62	
	gaacuaauuca cgccucauc	19
<210>	63	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo ApoE sintético	
<400>	63	
	tgggtcgctt ttgggattac	20
<210>	64	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso ApoE sintético	
<400>	64	
	ttcaactcct tcatggtctc g	21
<210>	65	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo ADNJA4 sintético	
<400>	65	
	ccagcttctc ttcacccatg	20
<210>	66	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso ADNJA4 sintético	
<400>	66	
	gccaatttct tcgtgactcc	20
<210>	67	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador directo GAPDH sintético	

<p><400> 67 agccacatcg ctcagacac</p>	19
<p><210> 68 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador sintético GAPDH sintético</p>	
<p><400> 68 gcccaatagc accaaatcc</p>	19
<p><210> 69 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador directo LRP1 sintético</p>	
<p><400> 69 tttaacagca ccgagtacca g</p>	21
<p><210> 70 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador inverso LRP1 sintético</p>	
<p><400> 70 caggcagatg tcagagcag</p>	19
<p><210> 71 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador directo LRP8 sintético</p>	
<p><400> 71 gctaccctgg ctacgagatg</p>	20
<p><210> 72 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador inverso LRP8 sintético</p>	
<p><400> 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 ggggatacctt gatacctact c

31

<210> 77
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 77
taattgcggc cgtcagaca 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

<p><400> 83 caattgcggc cgcttatctc tcataccagc tcaat</p>	35
<p><210> 84 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 84 gccagcgctg ggaactggca actggtcgct tttgggatta cct</p>	43
<p><210> 85 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 85 cagcgggaga ccctgtcccc ataccagccg tcctcctggg gtg</p>	43
<p><210> 86 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 86 tccccgcccc agccgtcctc acaggggtgga ccctagttta ata</p>	43
<p><210> 87 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><400> 87 gggatcggtg gagaagtgcc tattgtgcaa ggggcggggg atg</p>	43
<p><210> 88 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 88 gtagggggcg gggaacgtgt tatccgtgaa gaggtggcta ggg</p>	43
<p><210> 89 <211> 43</p>	

<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 gaccagggtc 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 gcgaactgag

20

<210> 96

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 96

aagtttttga aggcaagatg c

21

<210> 97

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 97

gcggtctggc agtaaaaaact atc

23

<210> 98

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 98

gtgaaacagc attgctgtca ctt

23

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 99

ctaggccaca gaattgaaag atct

24

<210> 100
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 100
gtaggtggaa attctagcat catcc

25

<210> 101
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 101
gcctagccga gggagagccg

20

<210> 102
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 102
tgtgacttgg gagctctgca gc

22

<210> 103
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 103
gccgccccga ctgcatct

18

<210> 104
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 104
tcagtggagg gaaggaaatg

20

<210> 105
<211> 20
<212> ADN

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador sintético

<400> 105
ttcctgccct ggacacttac

20

<210> 106
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 106
ttgtgccag 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

<400> 110	
ccggccgact gatgttccca cggatctcga gatccgtggg aacatcagtc ggttttt	57
<210> 111	
<211> 57	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sintético	
<400> 111	
ccgggcaact caatgatgcc gagttctcga gaactcggca tcattgagtt gcttttt	57
<210> 112	
<211> 57	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sintético	
<400> 112	
ccggagagtg tatcaccttc ttgaactcga gttcaagaag gtgatacact ctttttt	57
<210> 113	
<211> 57	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sintético	
<400> 113	
ccgggaaggc atccactatc gagatctcga gatctcgata gtggatgcct tcttttt	57
<210> 114	
<211> 57	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sintético	
<400> 114	
ccgggcagac actgtctgag caggtctcga gacctgctca gacagtgtct gcttttt	57
<210> 115	
<211> 57	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sintético	

<p><400> 115</p> <p>ccgggcaact caatgatgct gaggttctcga gaactcagca tcattgagtt gcttttt</p>	57
<p><210> 116</p> <p><211> 58</p> <p><212> ADN</p> <p><213> Artificial</p>	
<p><220></p> <p><223> Sintético</p>	
<p><400> 116</p> <p>ccggtgagat catgttgcta gaaacctcga ggtttctagc aacatgatct catttttg</p>	58
<p><210> 117</p> <p><211> 57</p> <p><212> ADN</p> <p><213> Artificial</p>	
<p><220></p> <p><223> Sintético</p>	
<p><400> 117</p> <p>ccgggaggac actatgacgg aagtactcga gtacttccgt catagtgtcc tcttttt</p>	57
<p><210> 118</p> <p><211> 20</p> <p><212> ADN</p> <p><213> Artificial</p>	
<p><220></p> <p><223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 118</p> <p>tgggtcgctt ttgggattac</p>	20
<p><210> 119</p> <p><211> 21</p> <p><212> ADN</p> <p><213> Artificial</p>	
<p><220></p> <p><223> Cebador sintético</p>	
<p><400> 119</p> <p>ttcaactcct tcatggtctc g</p>	21
<p><210> 120</p> <p><211> 19</p> <p><212> ADN</p> <p><213> Artificial</p>	
<p><220></p> <p><223> Cebador sintético</p>	

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

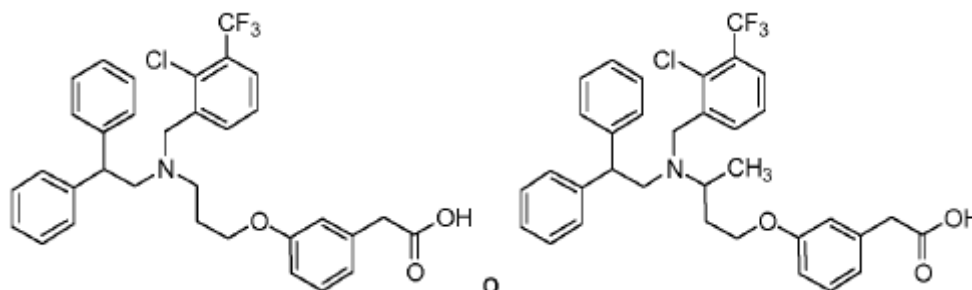
<220>

<223> Cebador sintético

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

REIVINDICACIONES

1. Un agonista de LXR β , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita mediante el incremento del nivel de expresión o el nivel de actividad de ApoE, en donde el cáncer metastásico es resistente a un antiproliferativo de la Tabla 2 y el agonista de LXR β es:



5 farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El agonista de LXR β para uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer metastásico es melanoma, cáncer de mama, cáncer de células renales, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, o cáncer de ovario.

3. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer es melanoma.

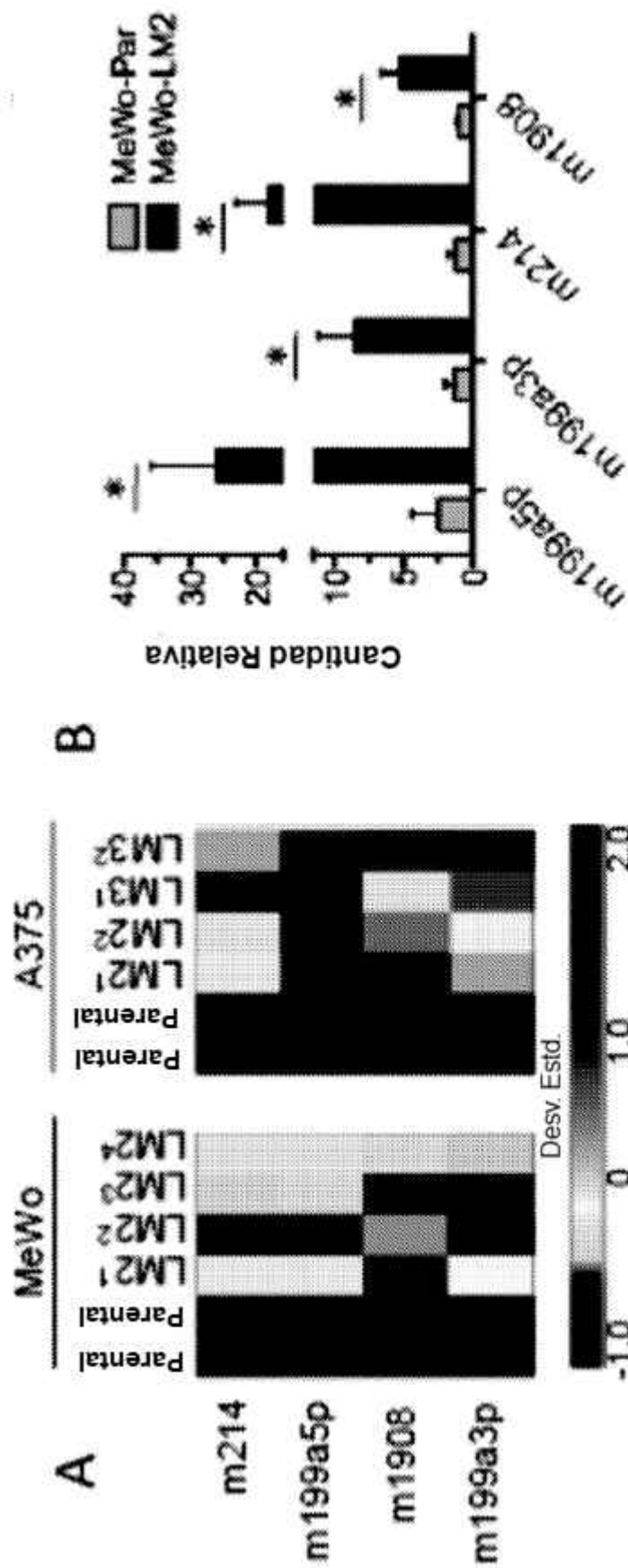
10 4. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer es cáncer de mama.

5. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

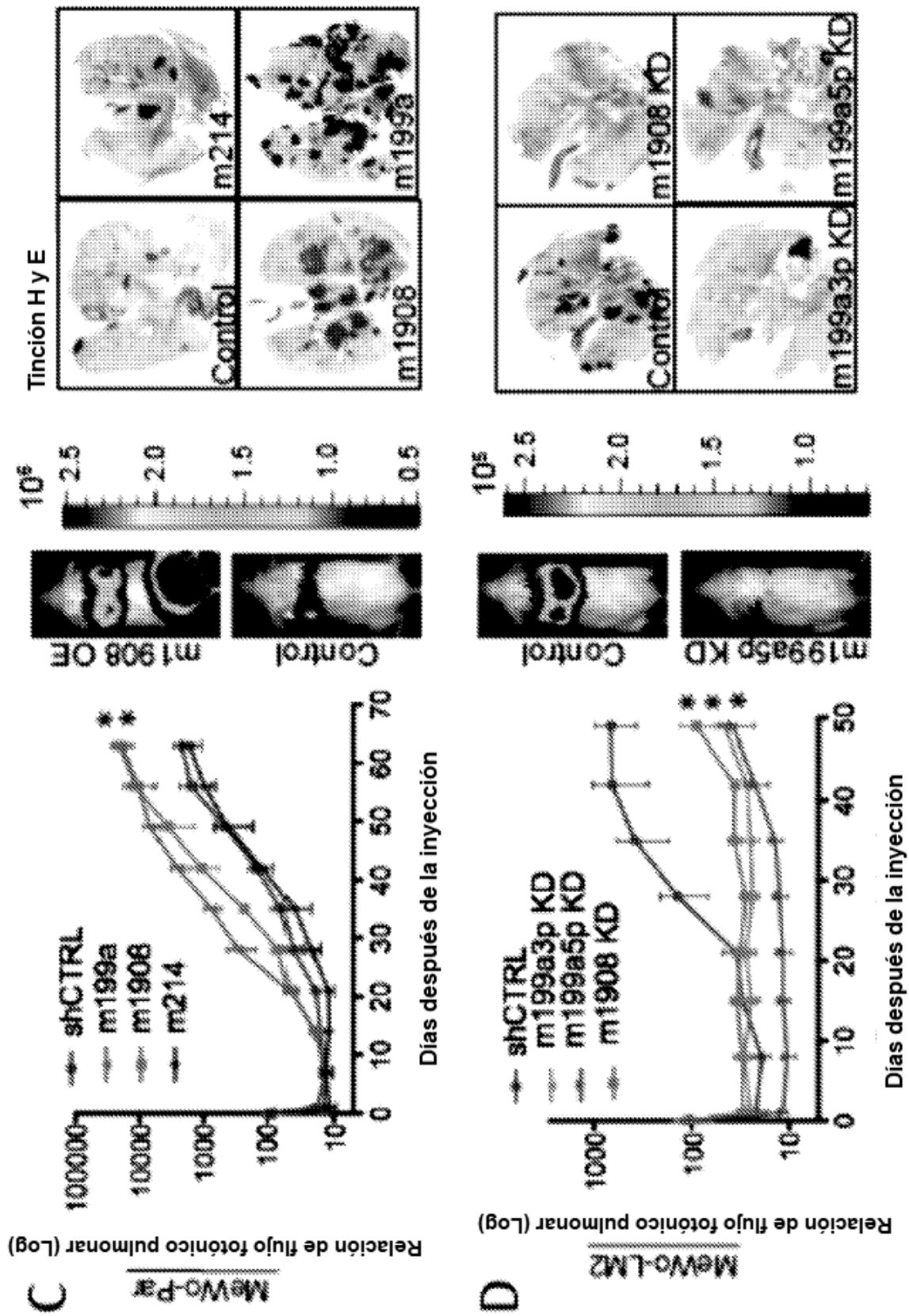
15 6. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer es cáncer de células renales.

7. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cáncer metastásico es resistente a vemurafenib, dacarbazina, un inhibidor de BRAF, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD1, un inhibidor de MEK, y/o un inhibidor de PDL1.

20 8. El agonista de LXR β para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento comprende administrar un antiproliferativo de la Tabla 2, en donde el agonista de LXR β y el antiproliferativo de la Tabla 2 se administran en una cantidad que, conjuntamente, es suficiente como para ralentizar la progresión del cáncer metastásico.



FIGURAS 1A-B



FIGURAS 1C-D

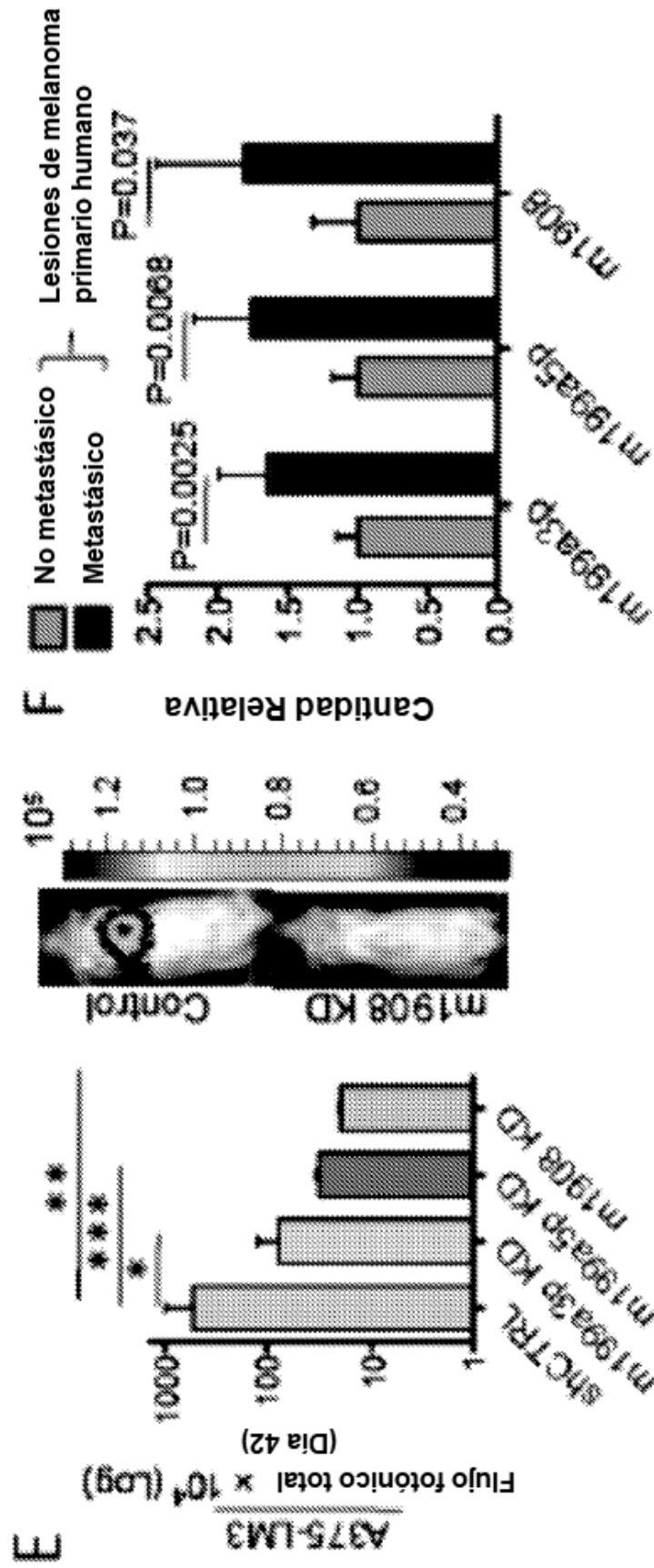
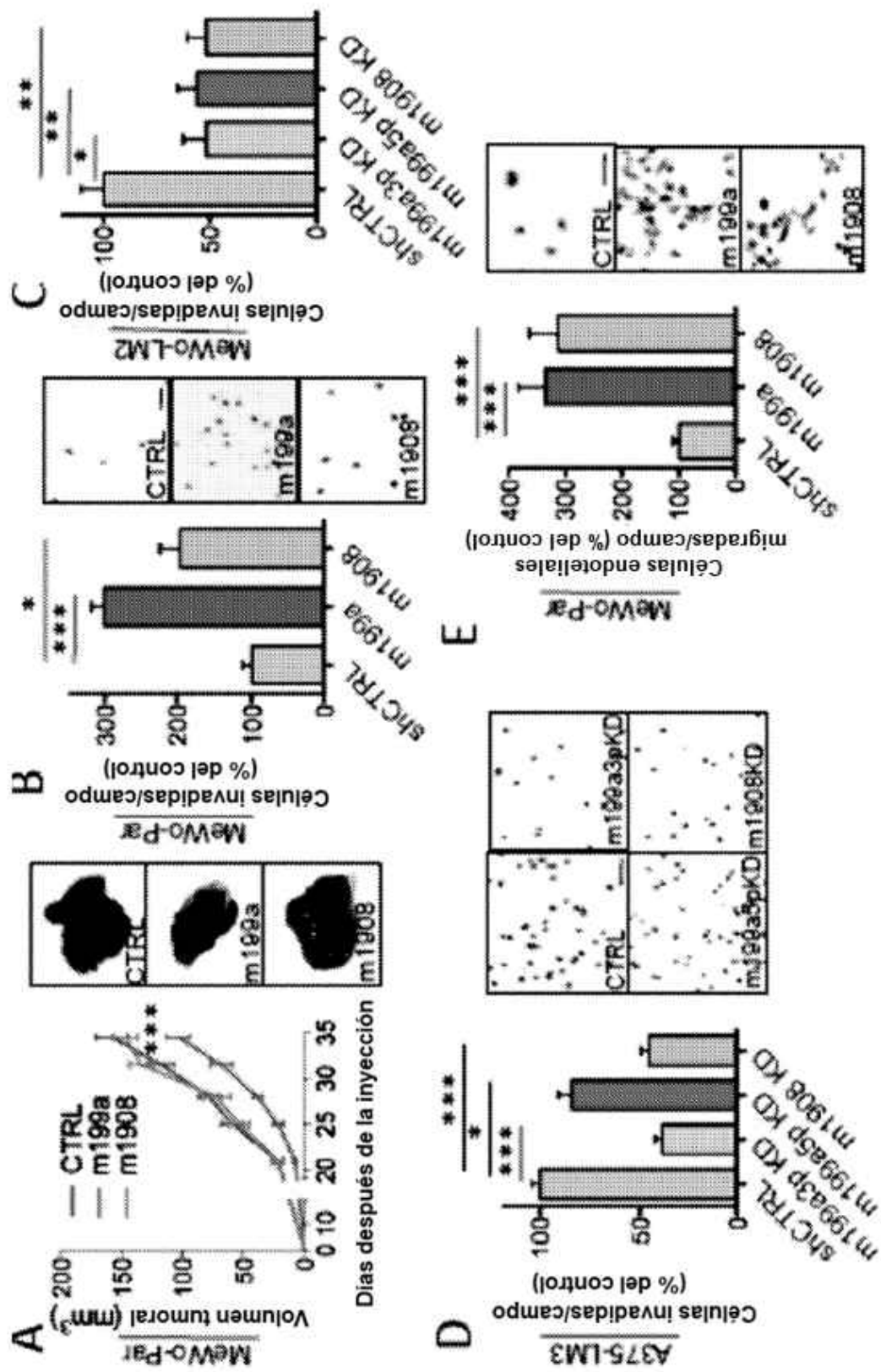


FIGURA 1E



FIGURAS 2A-E

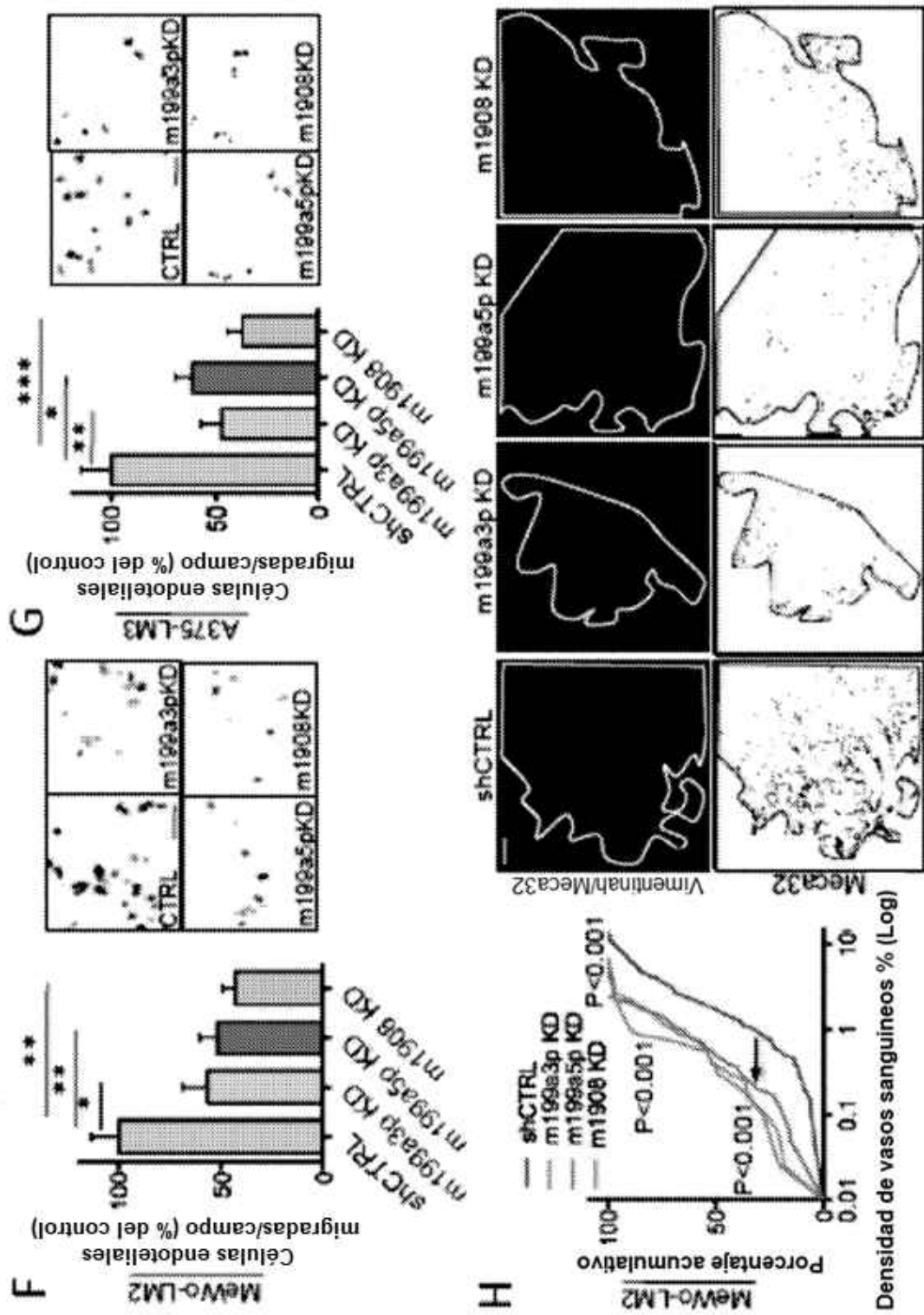
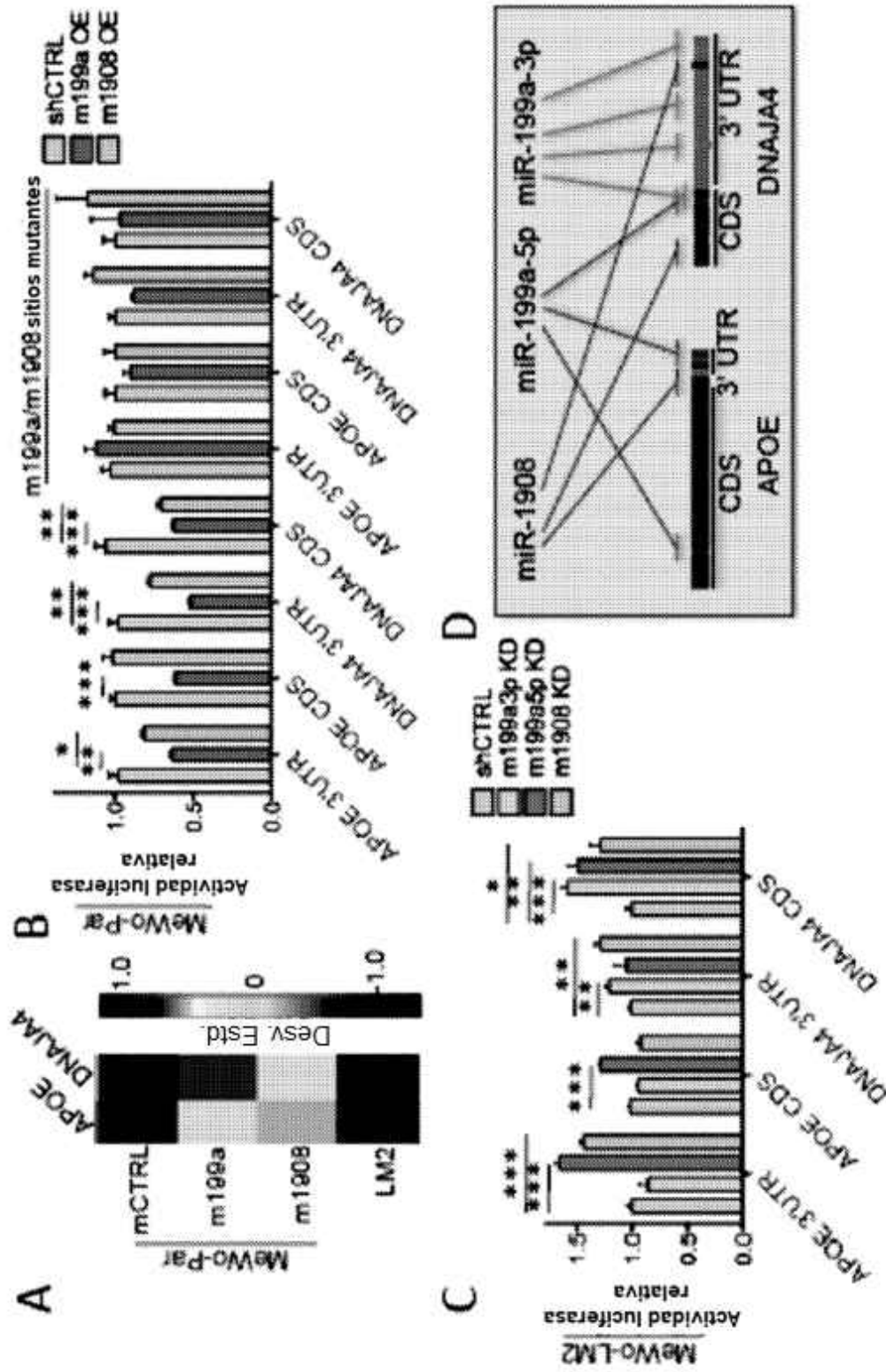
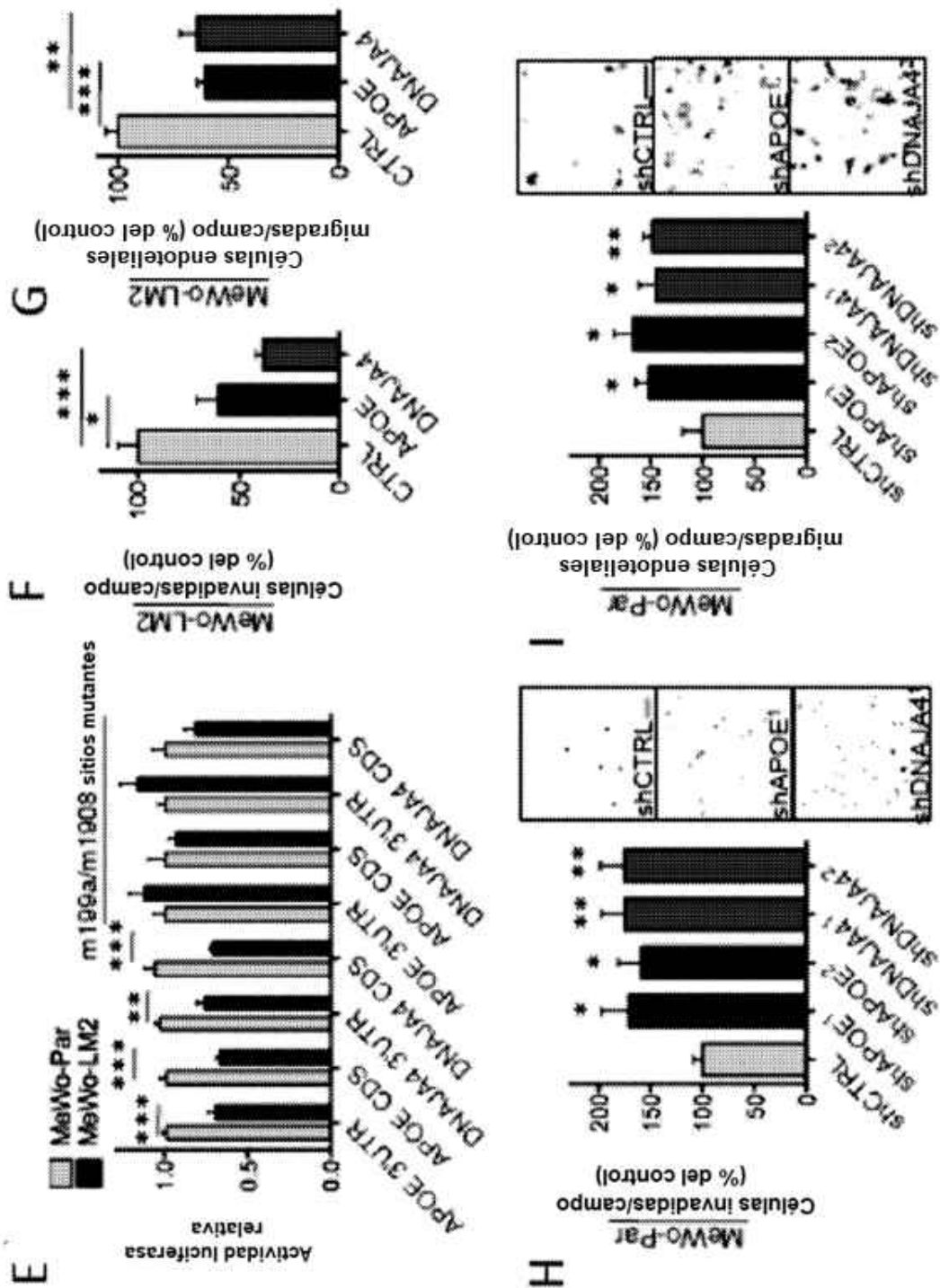


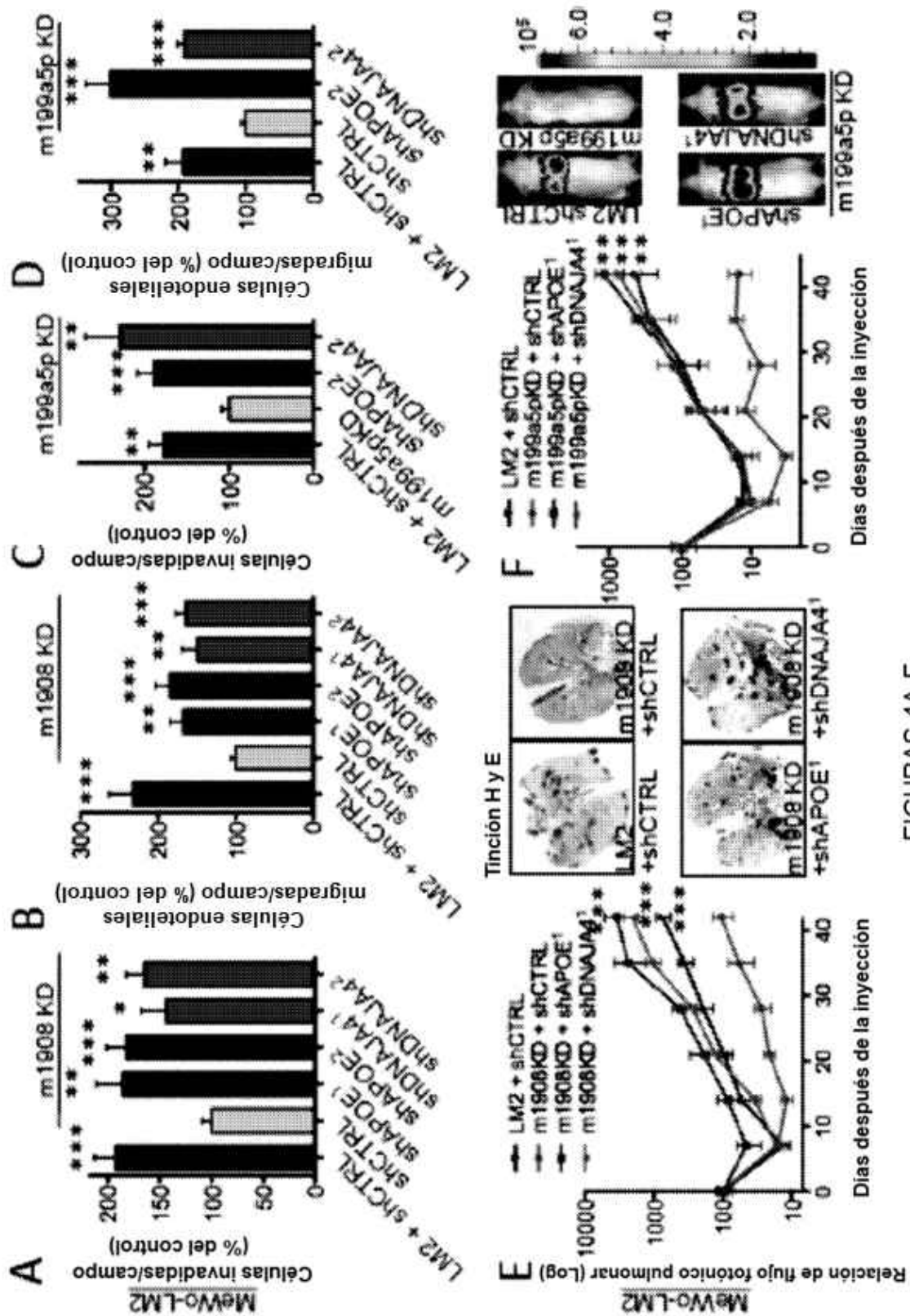
Figura 3



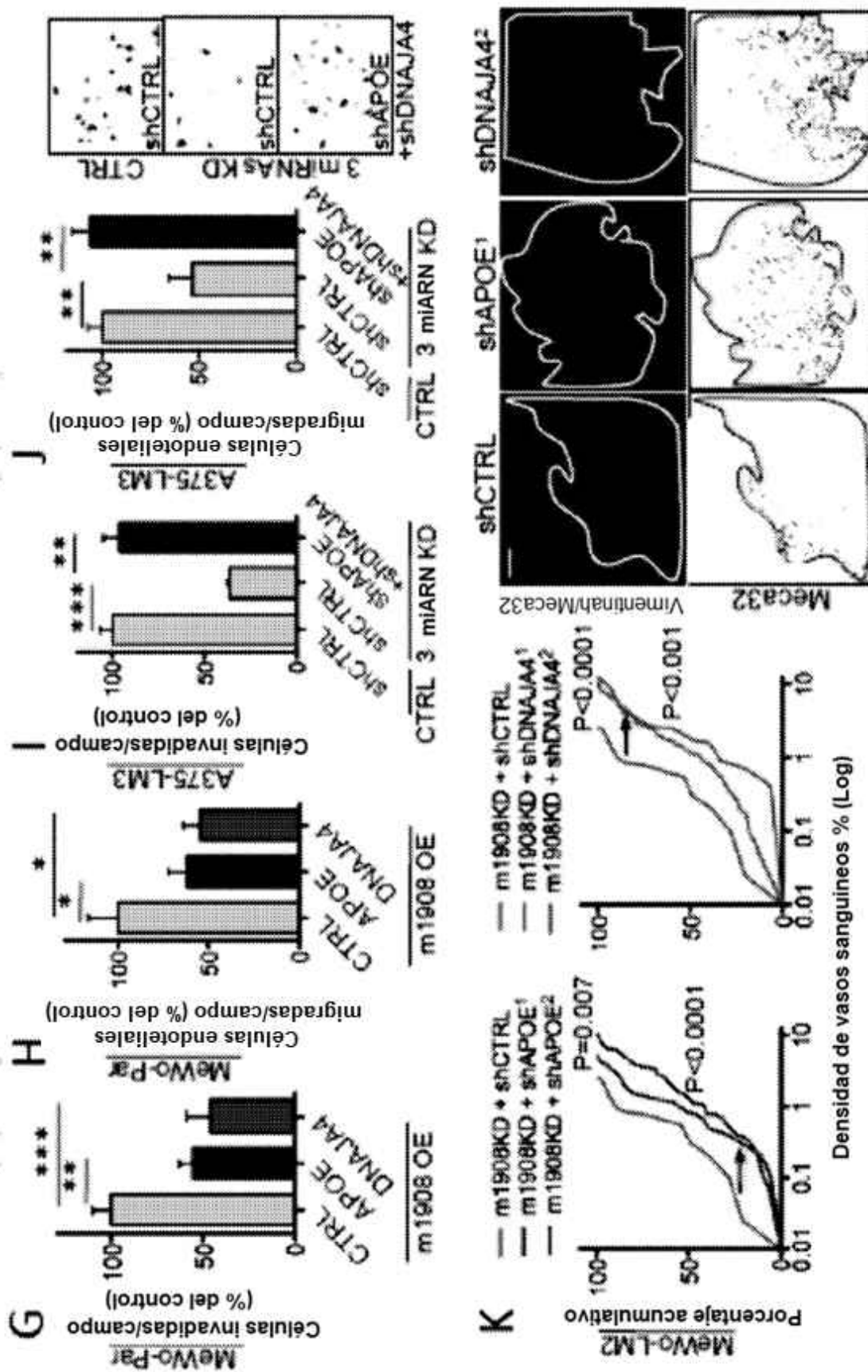
FIGURAS 3A-D



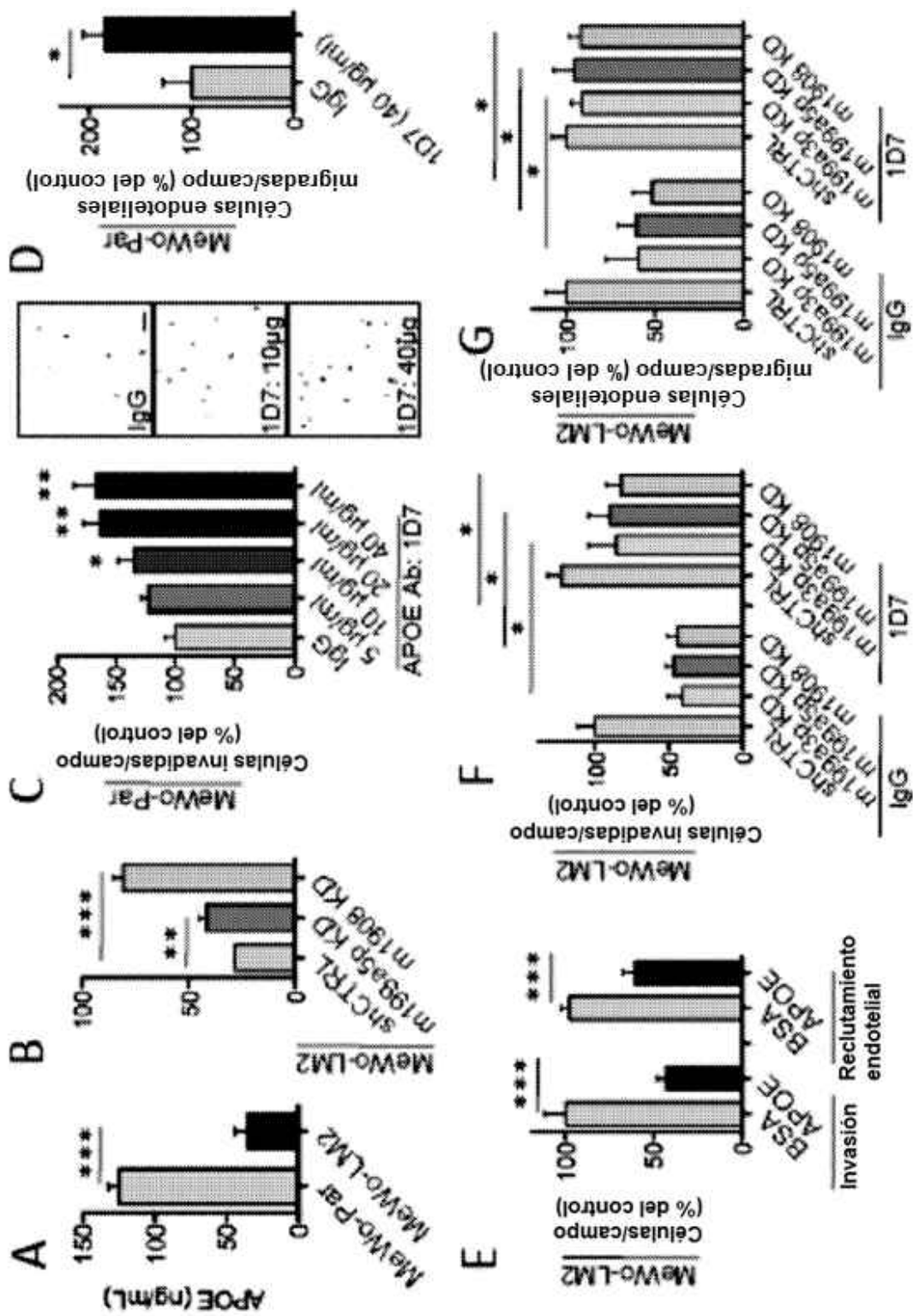
FIGURAS 3E-I



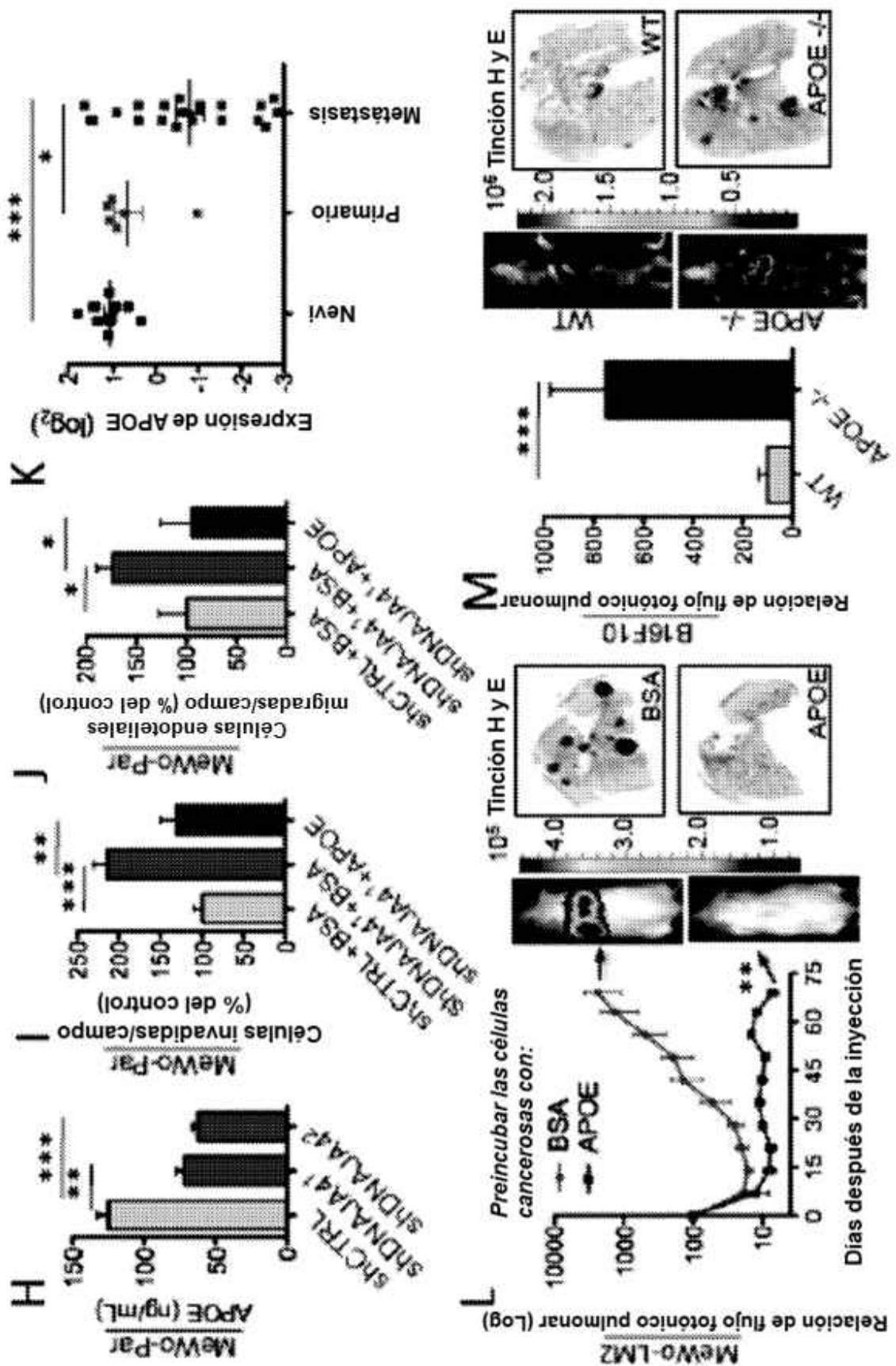
FIGURAS 4A-F



FIGURAS 4G-K

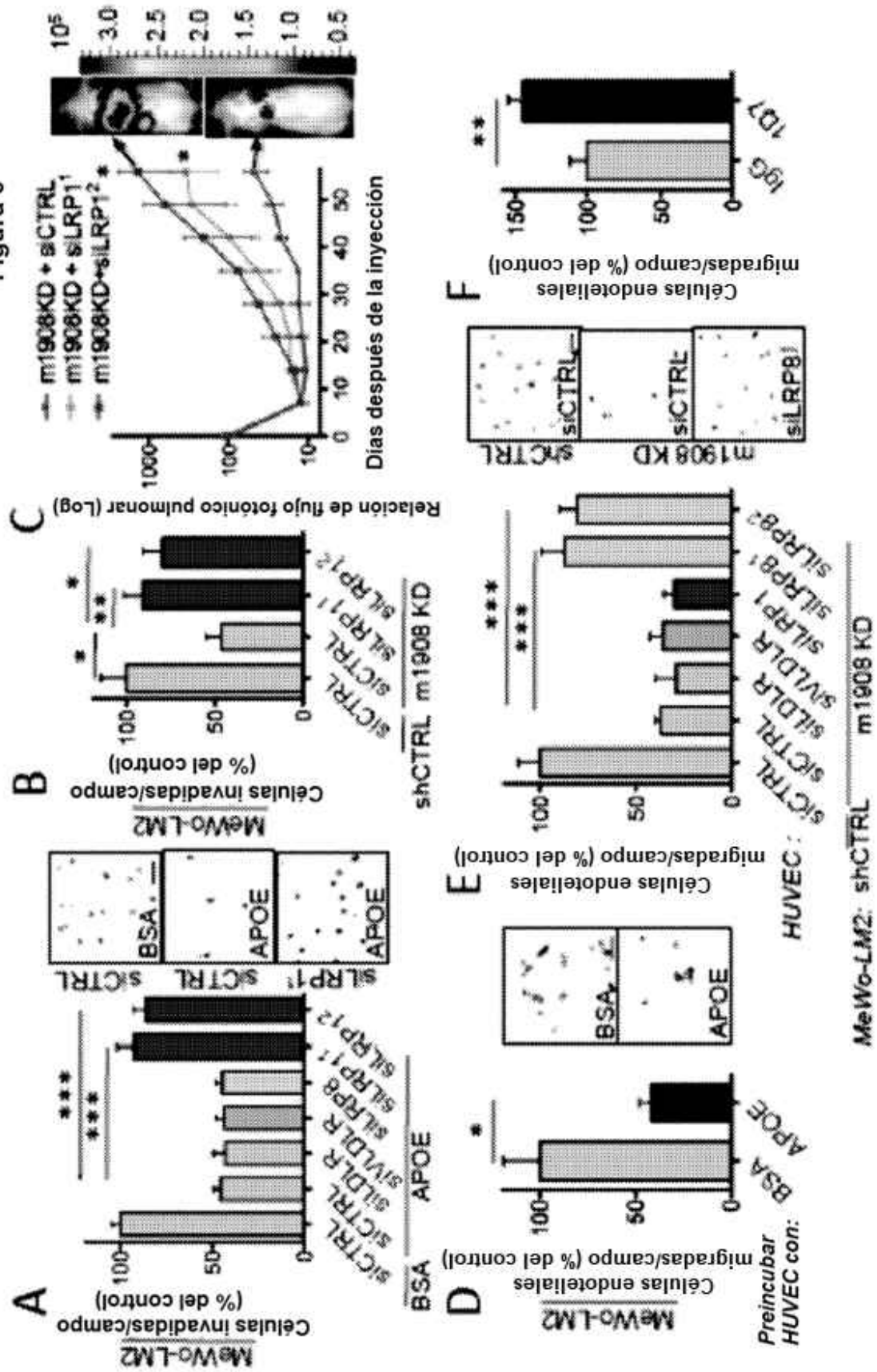


FIGURAS 5A-G

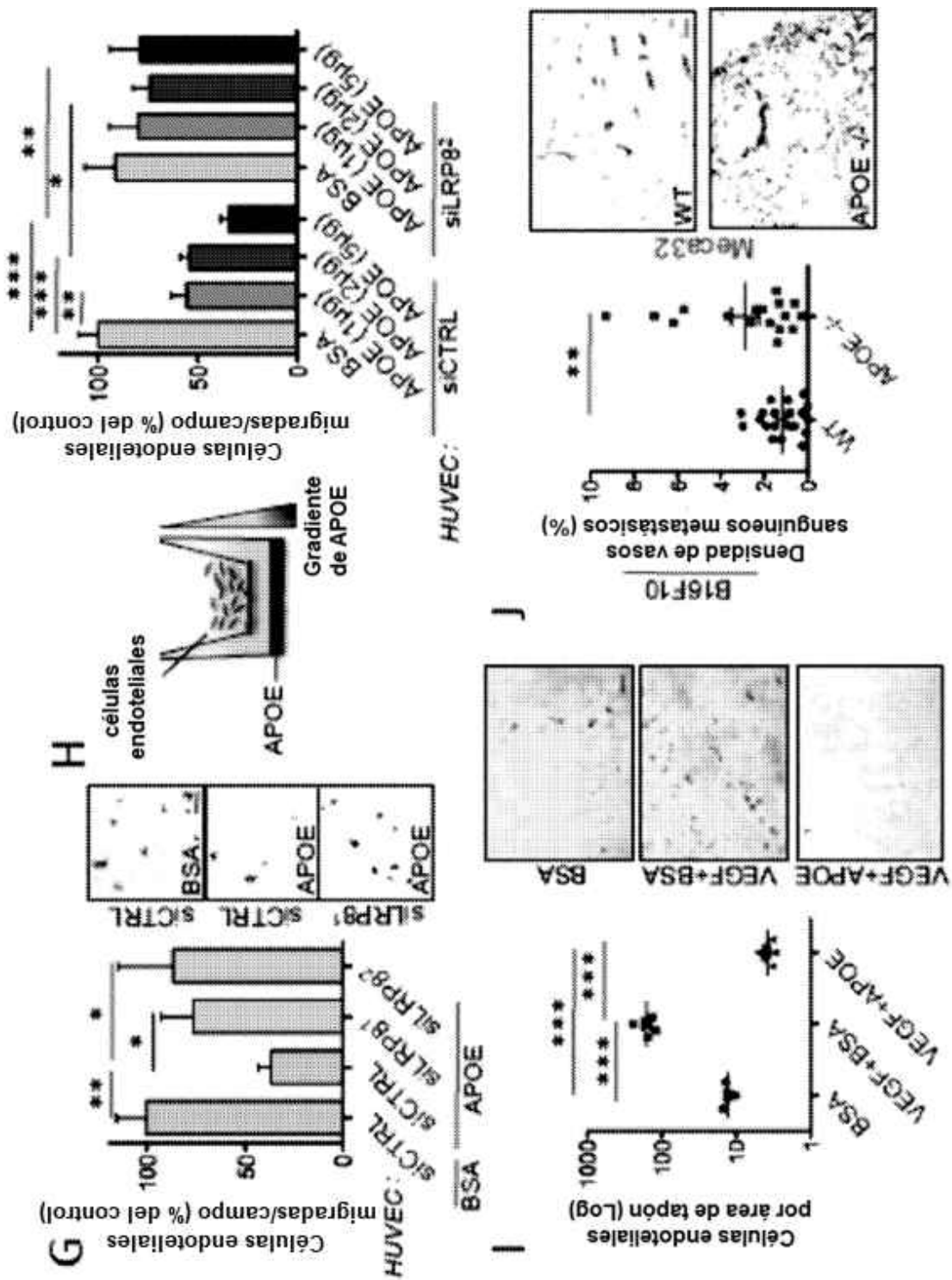


FIGURAS 5H-M

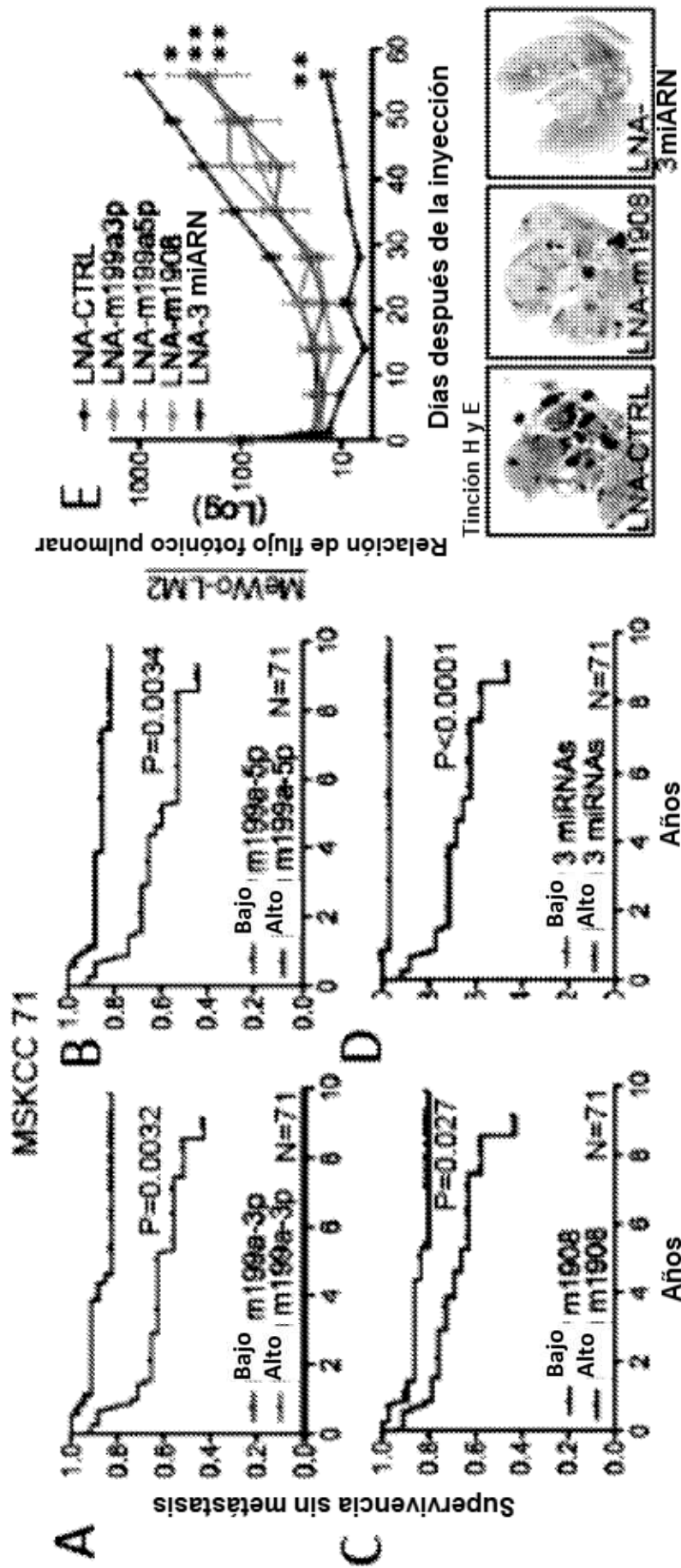
Figura 6

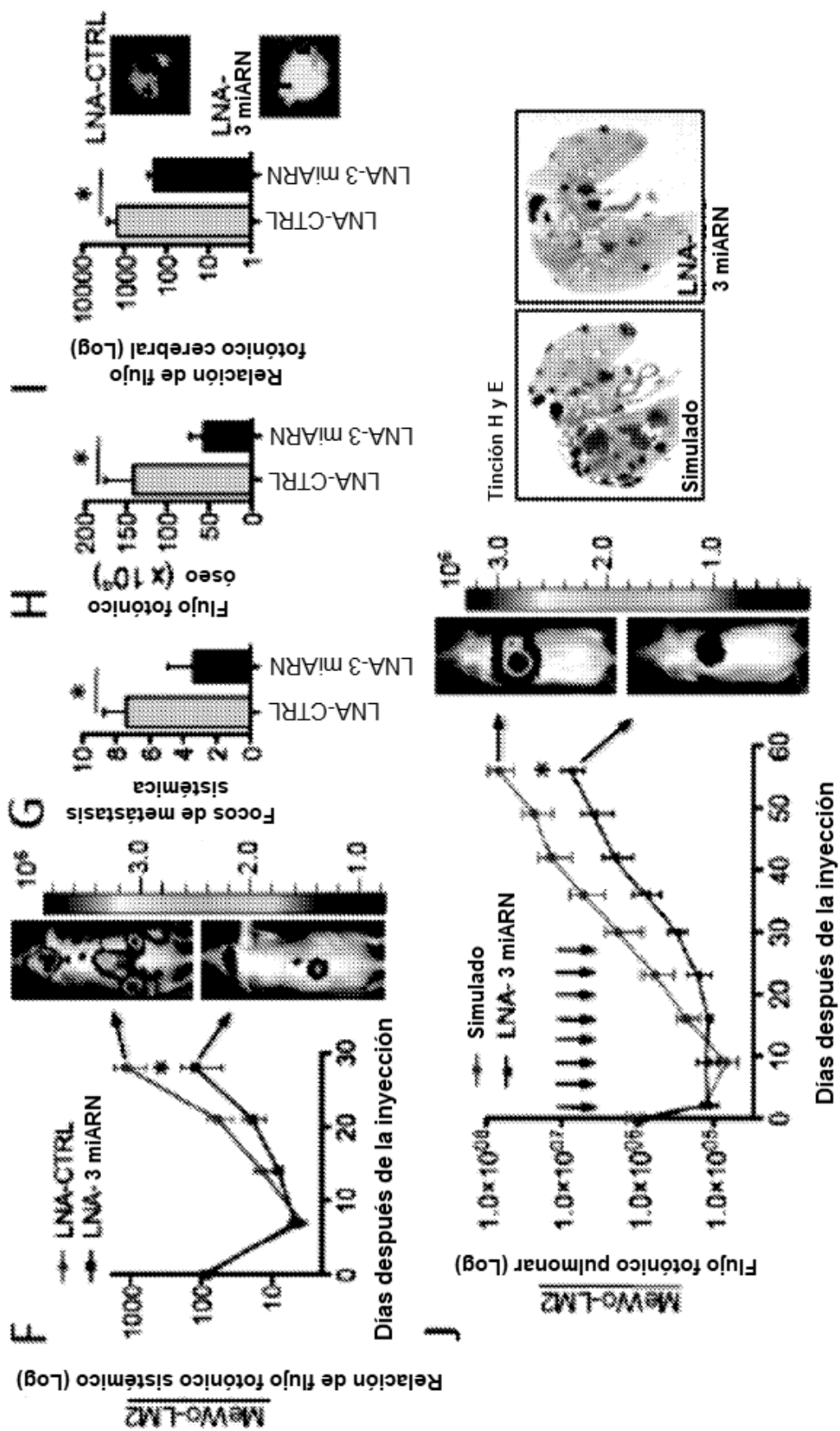


FIGURAS 6A-F



FIGURAS 6G-J





FIGURAS 7F-J

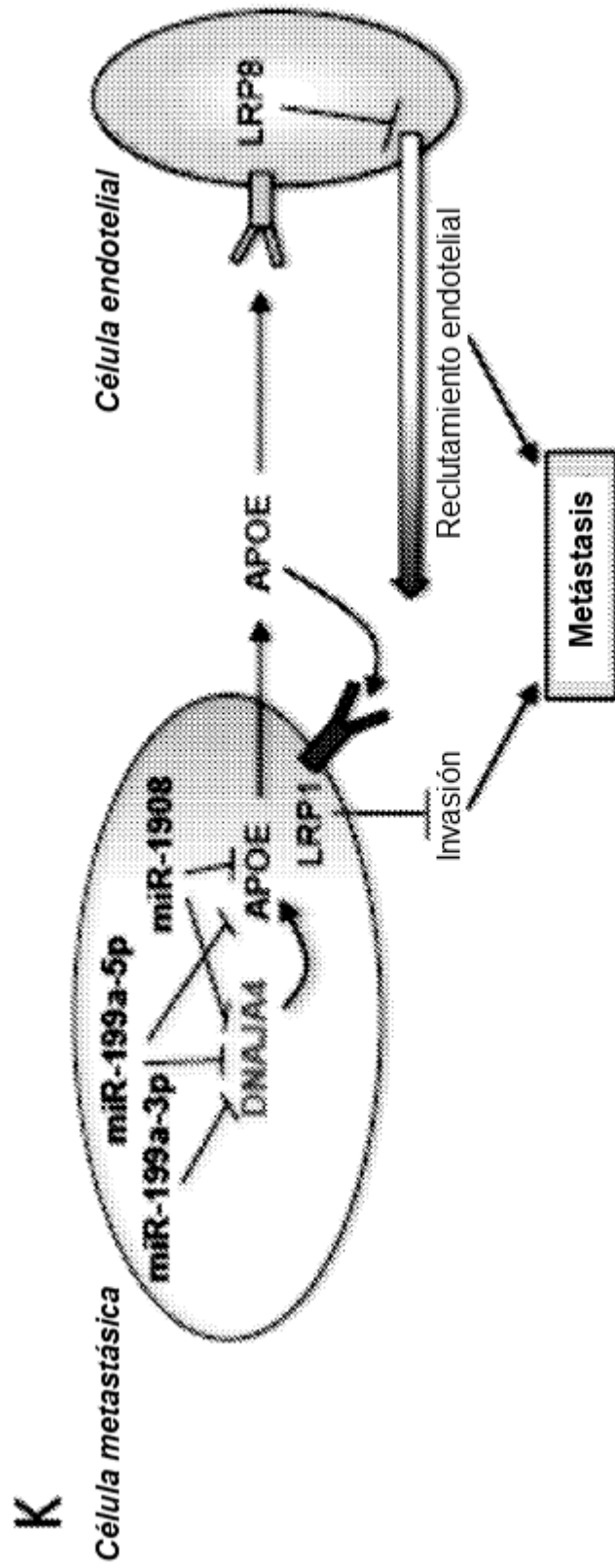
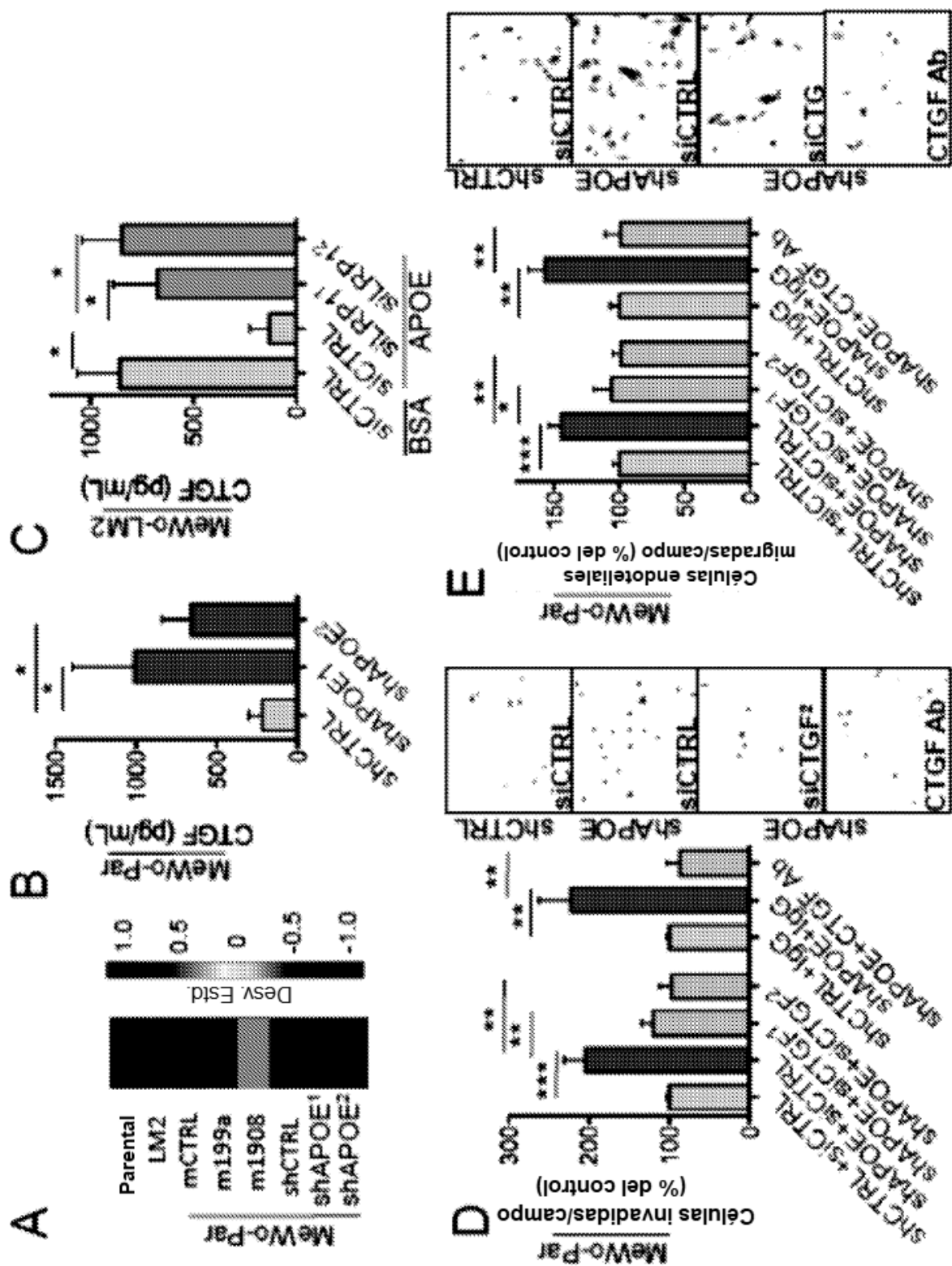
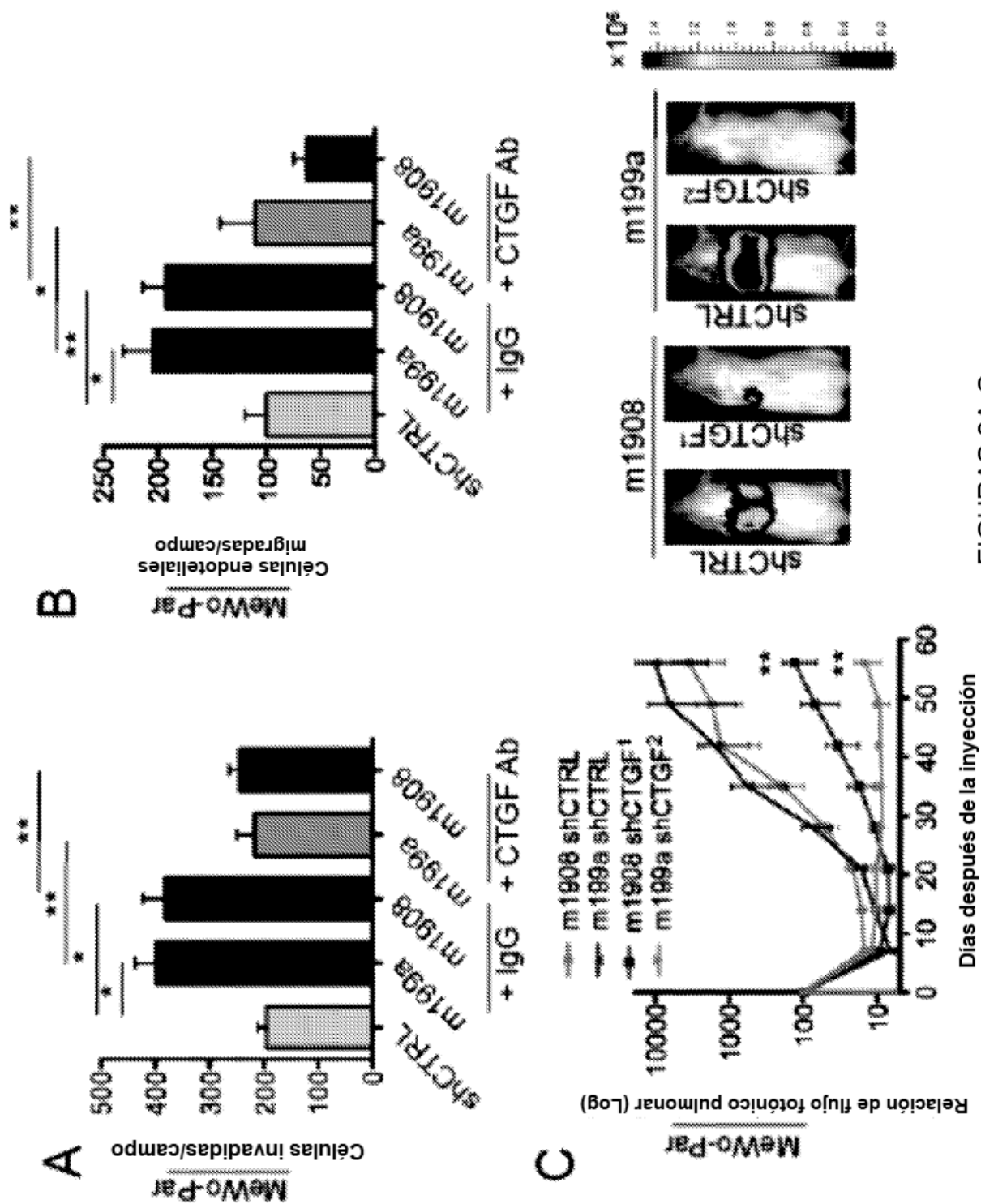
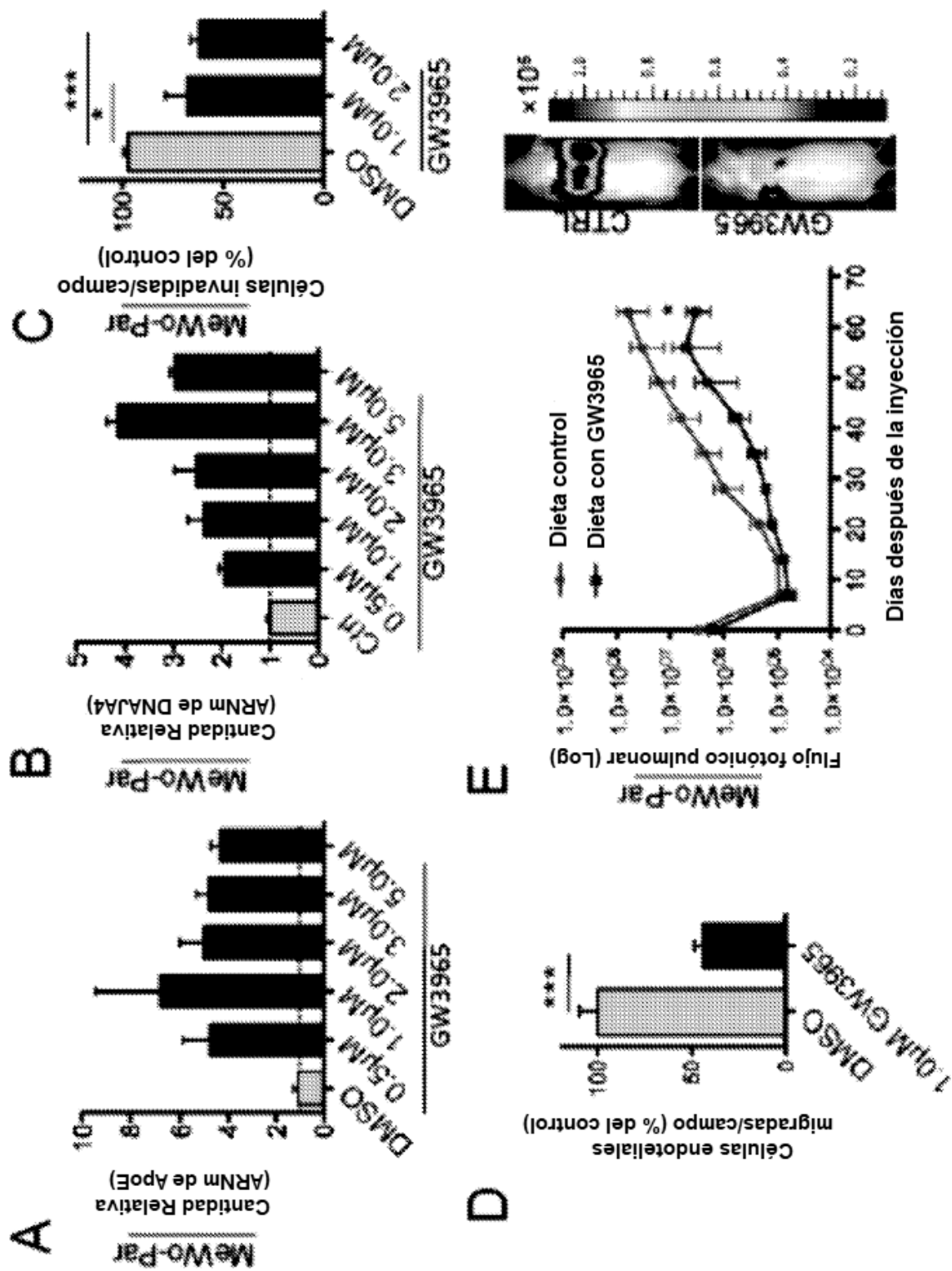


FIGURA 7K

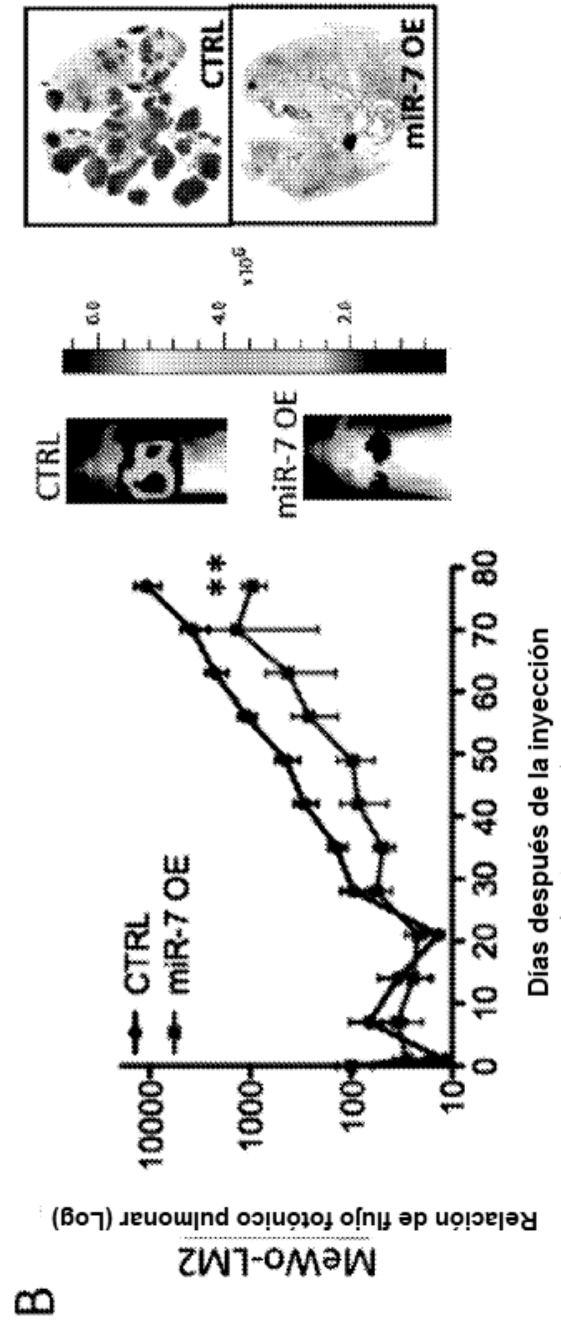
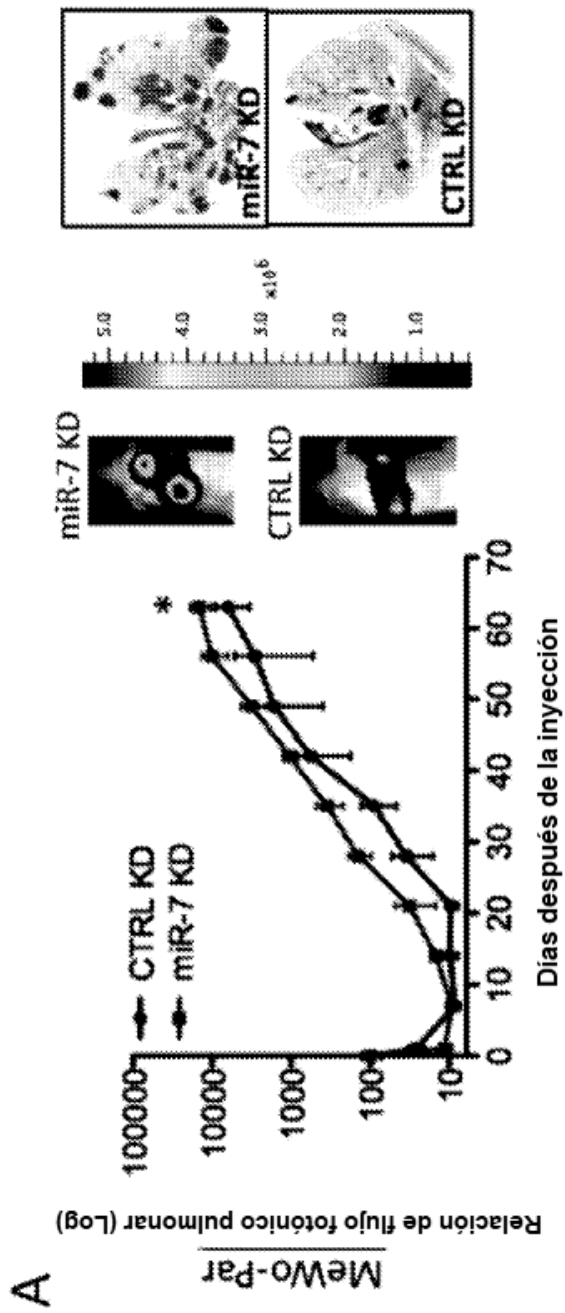


FIGURAS 8A-E

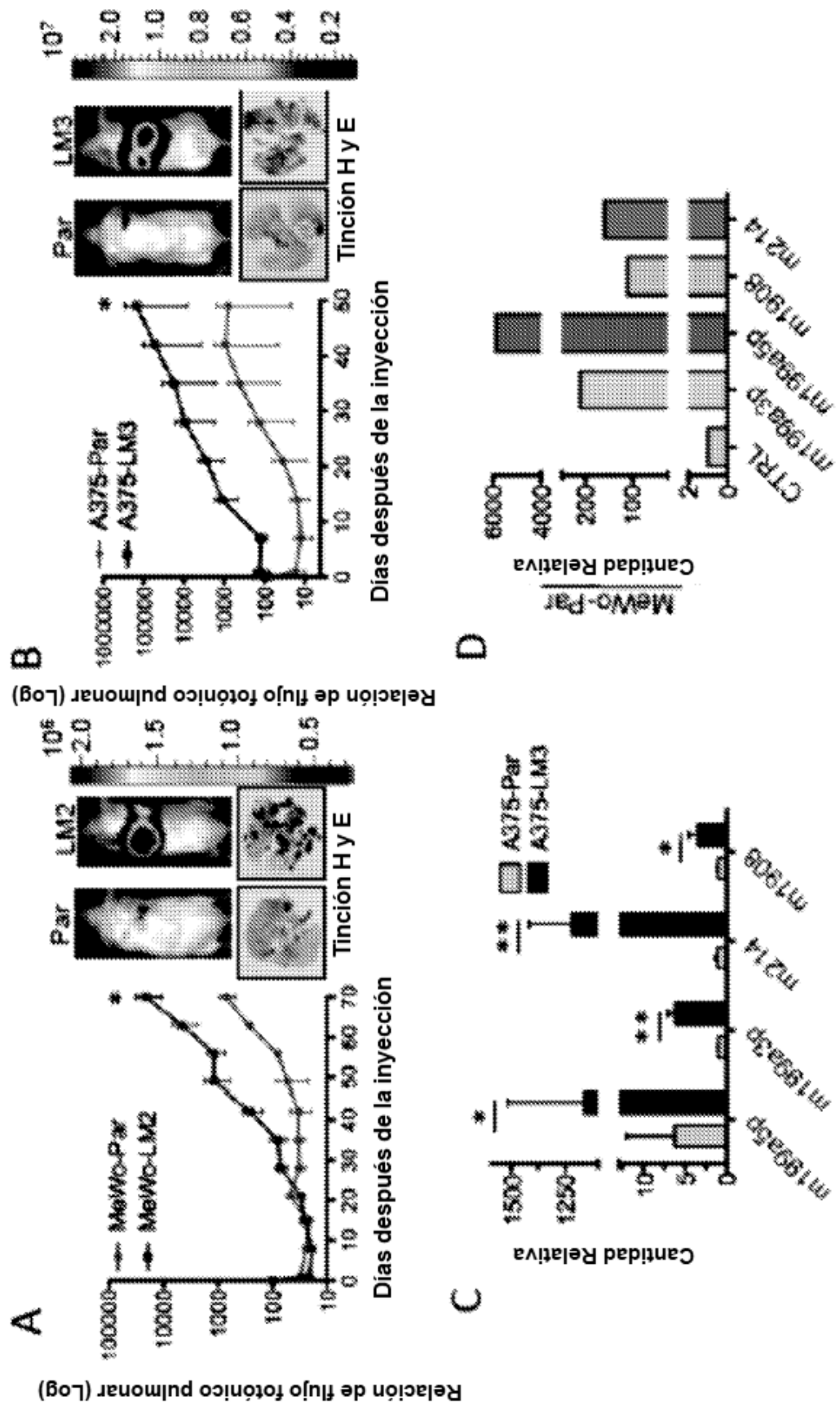




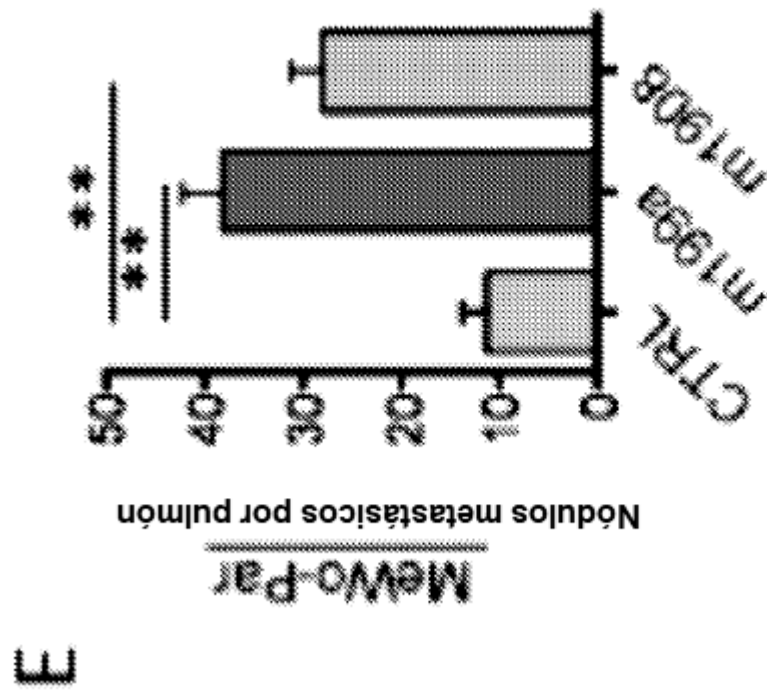
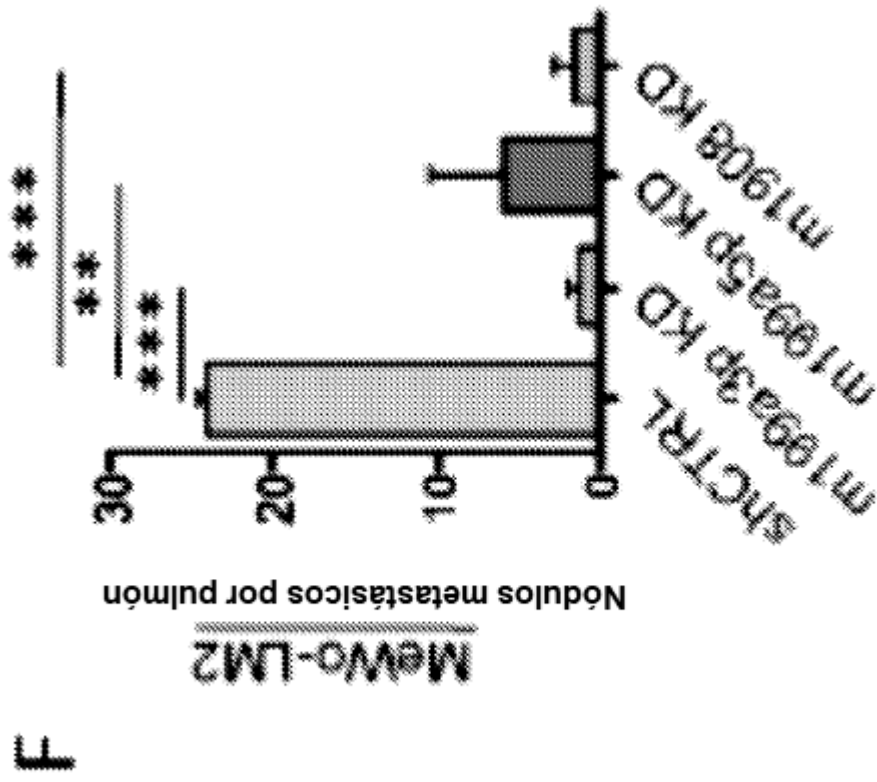
FIGURAS 10A-E



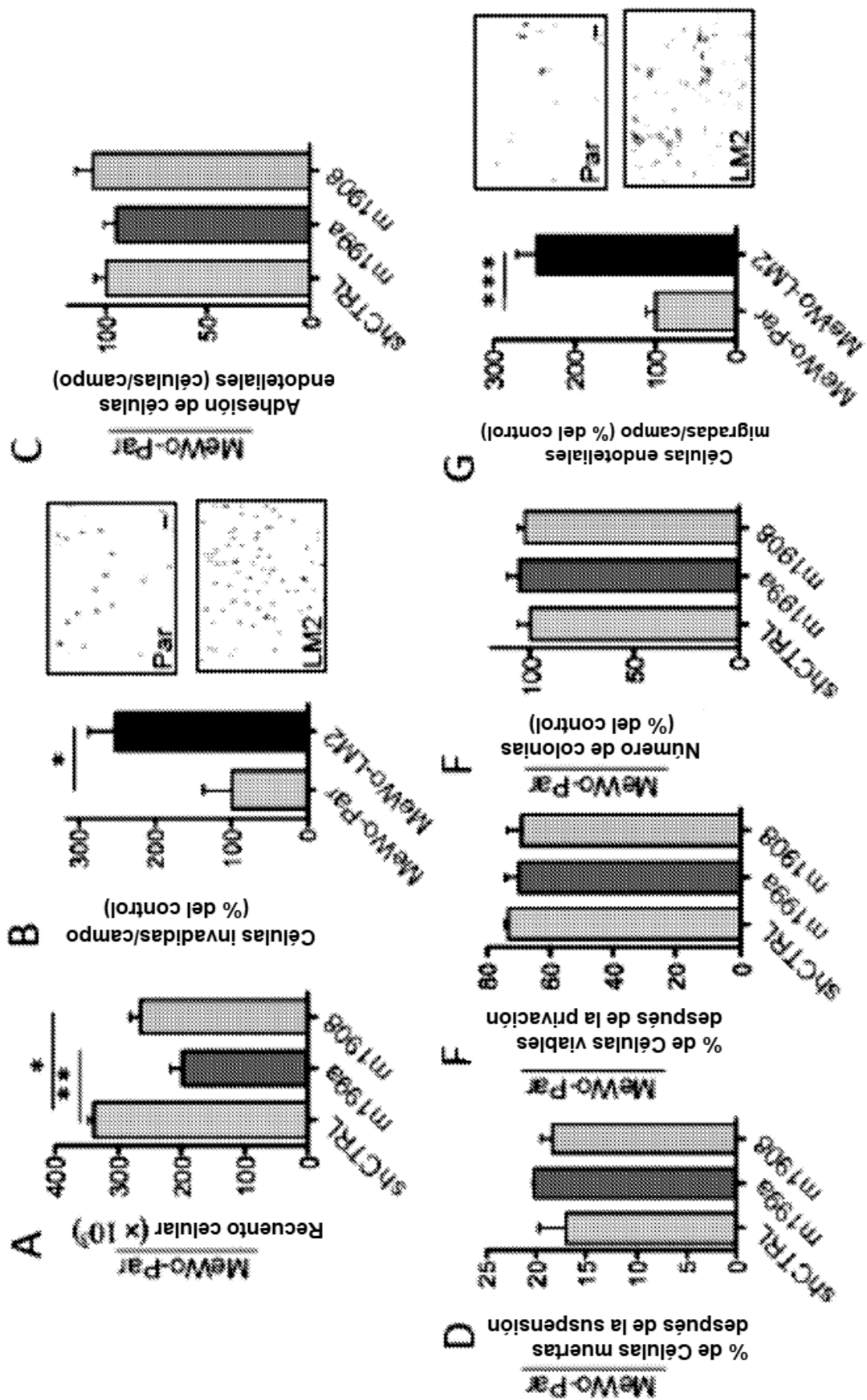
FIGURAS 11A-B



FIGURAS 12A-D



FIGURAS 12E-F



FIGURAS 13A-G

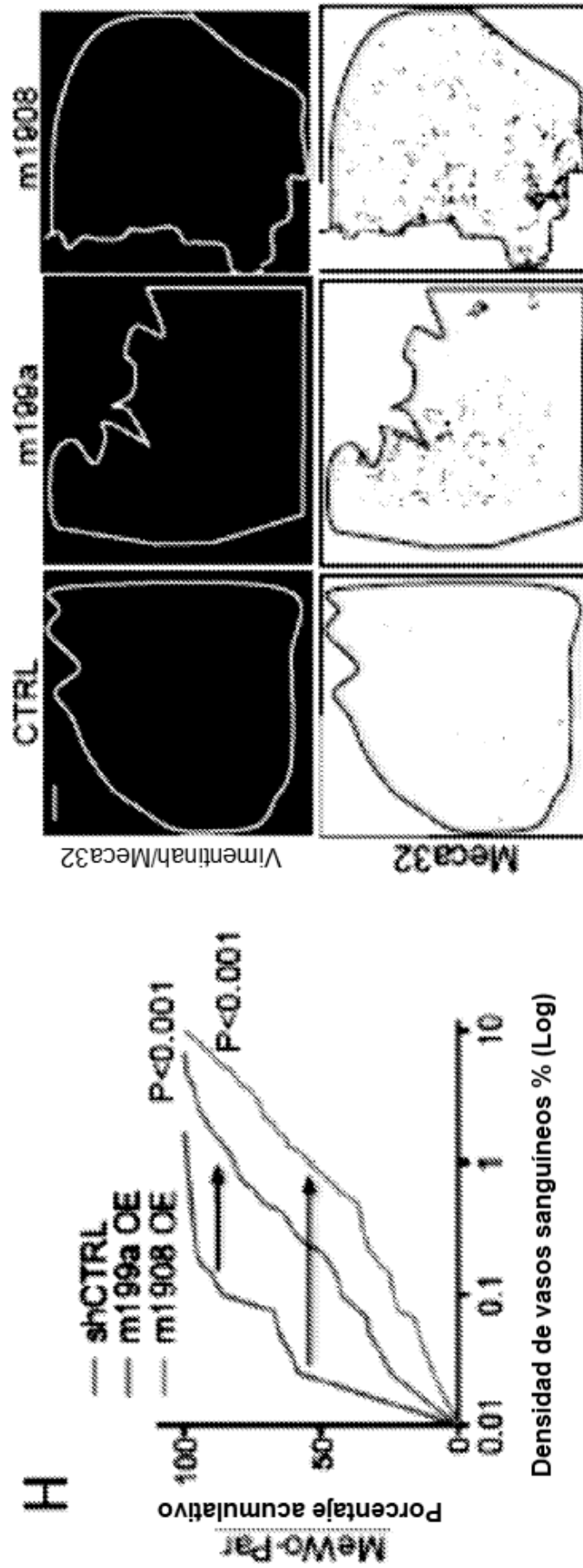
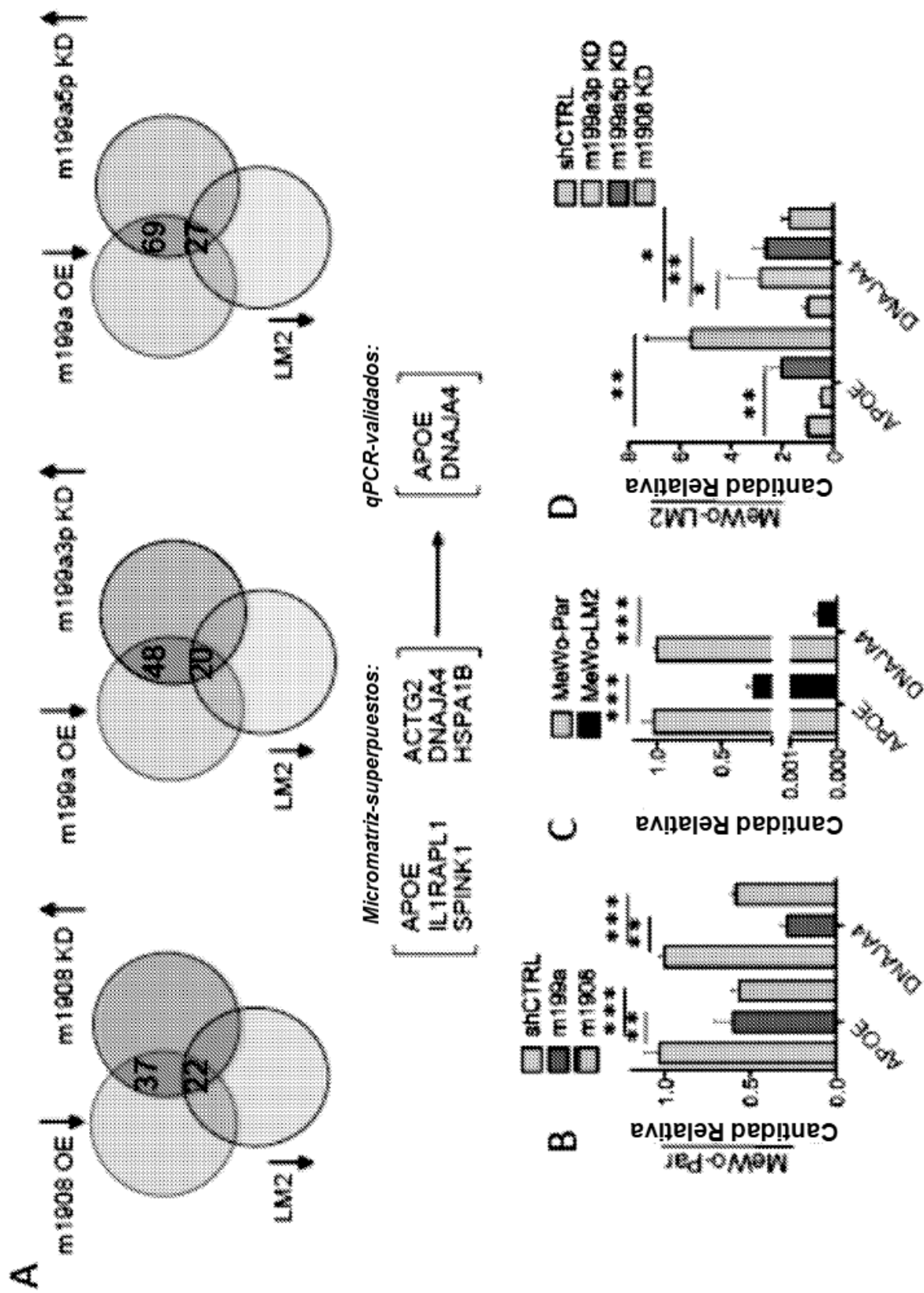
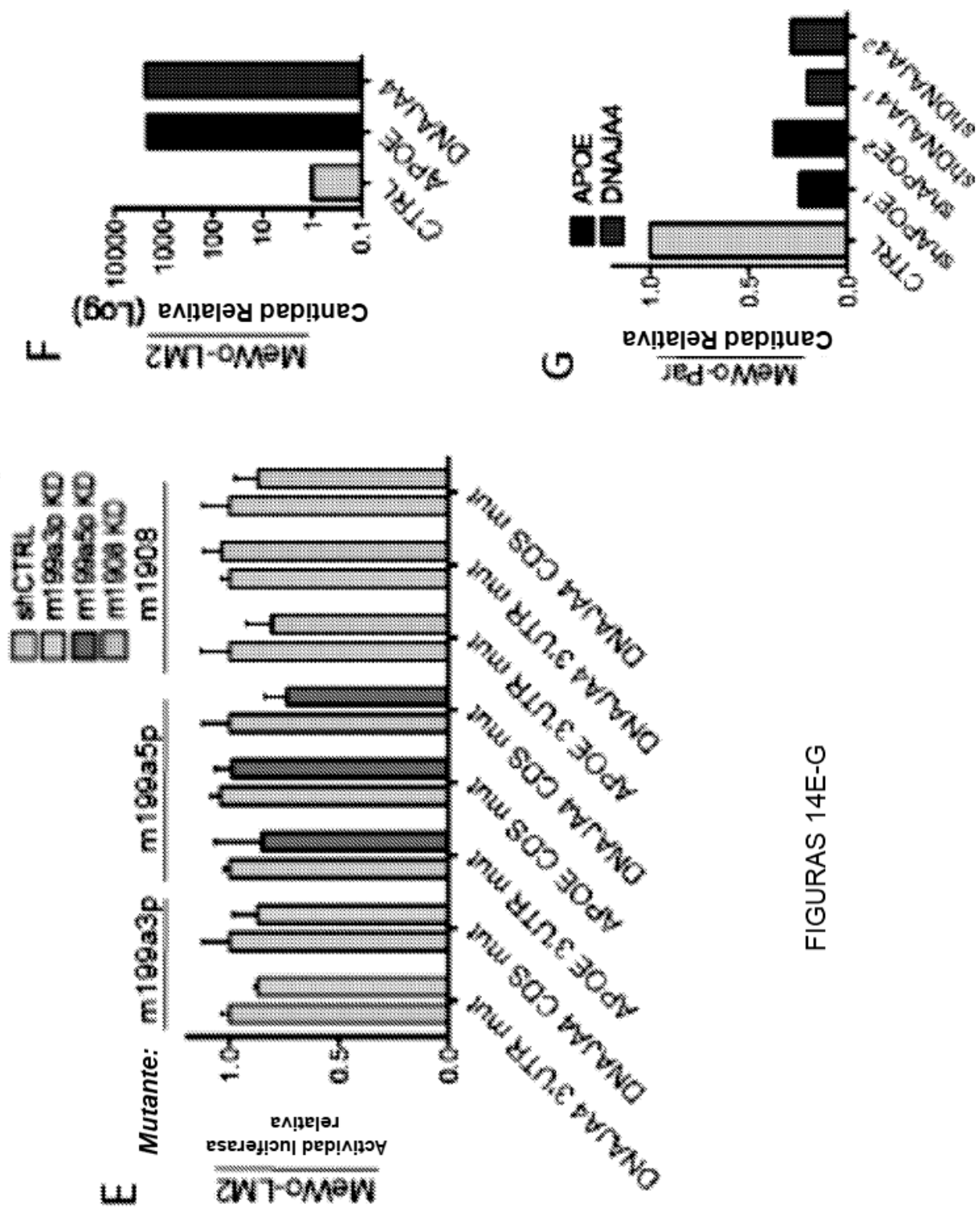


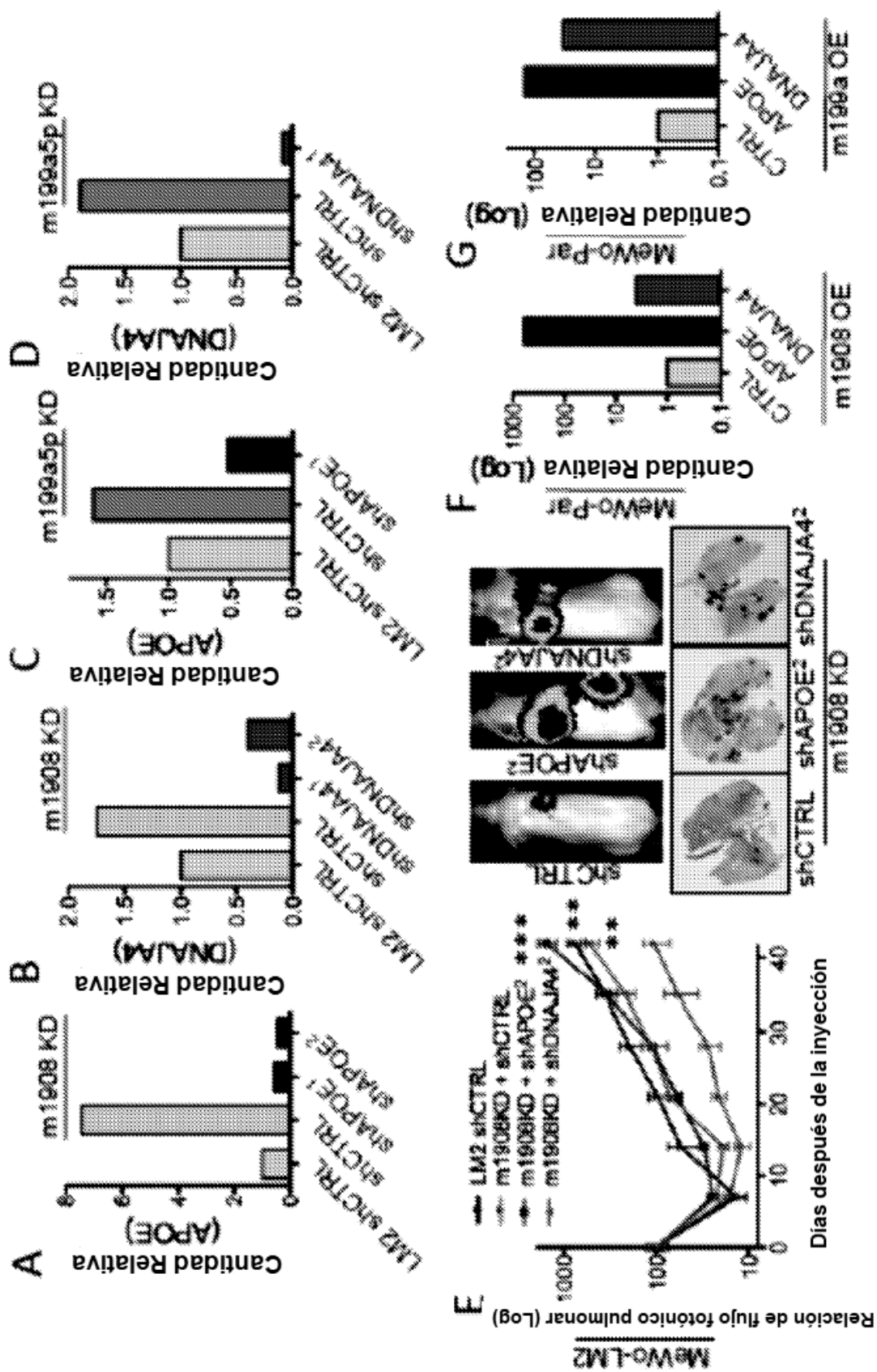
FIGURA 13H



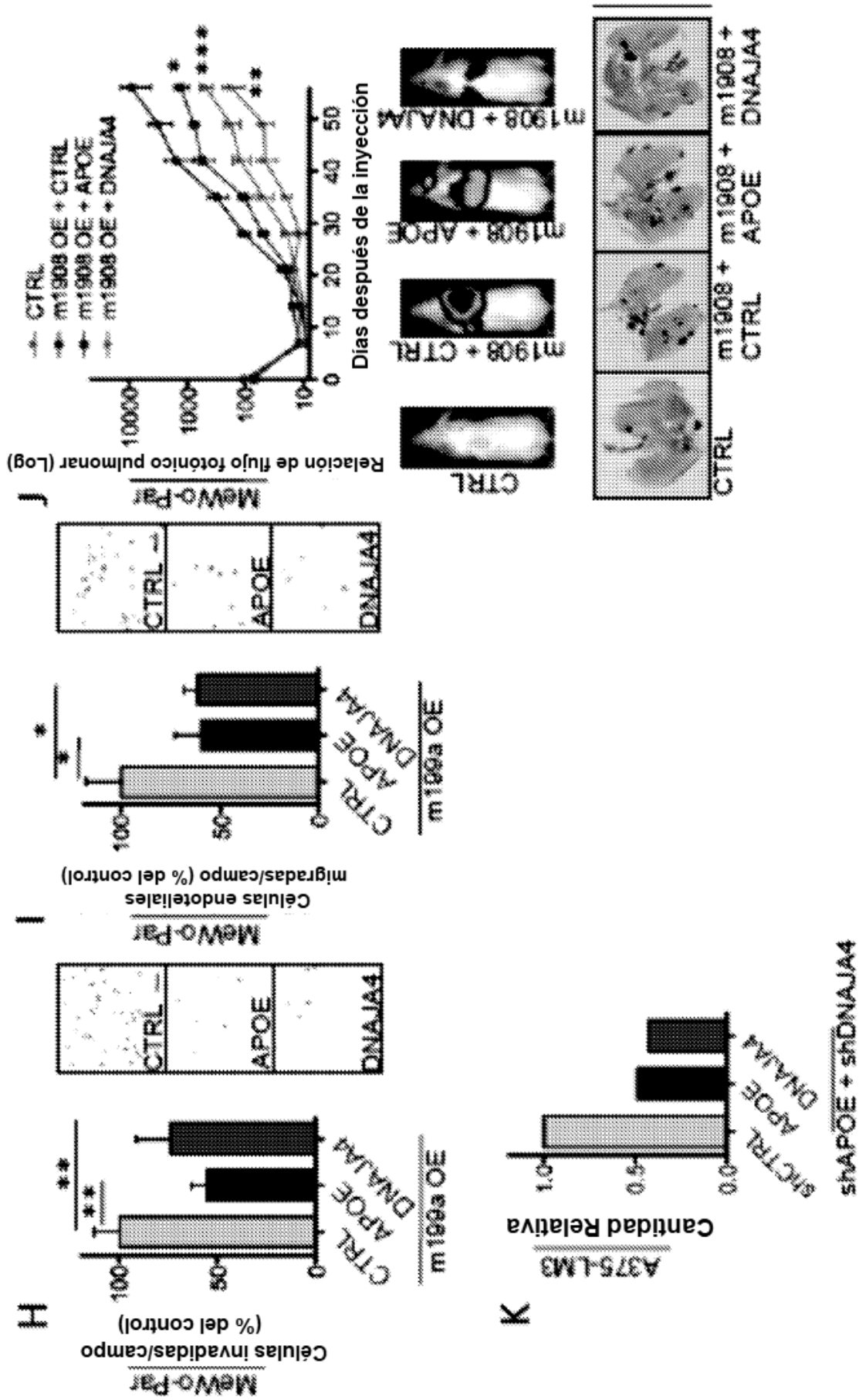
FIGURAS 14A-D



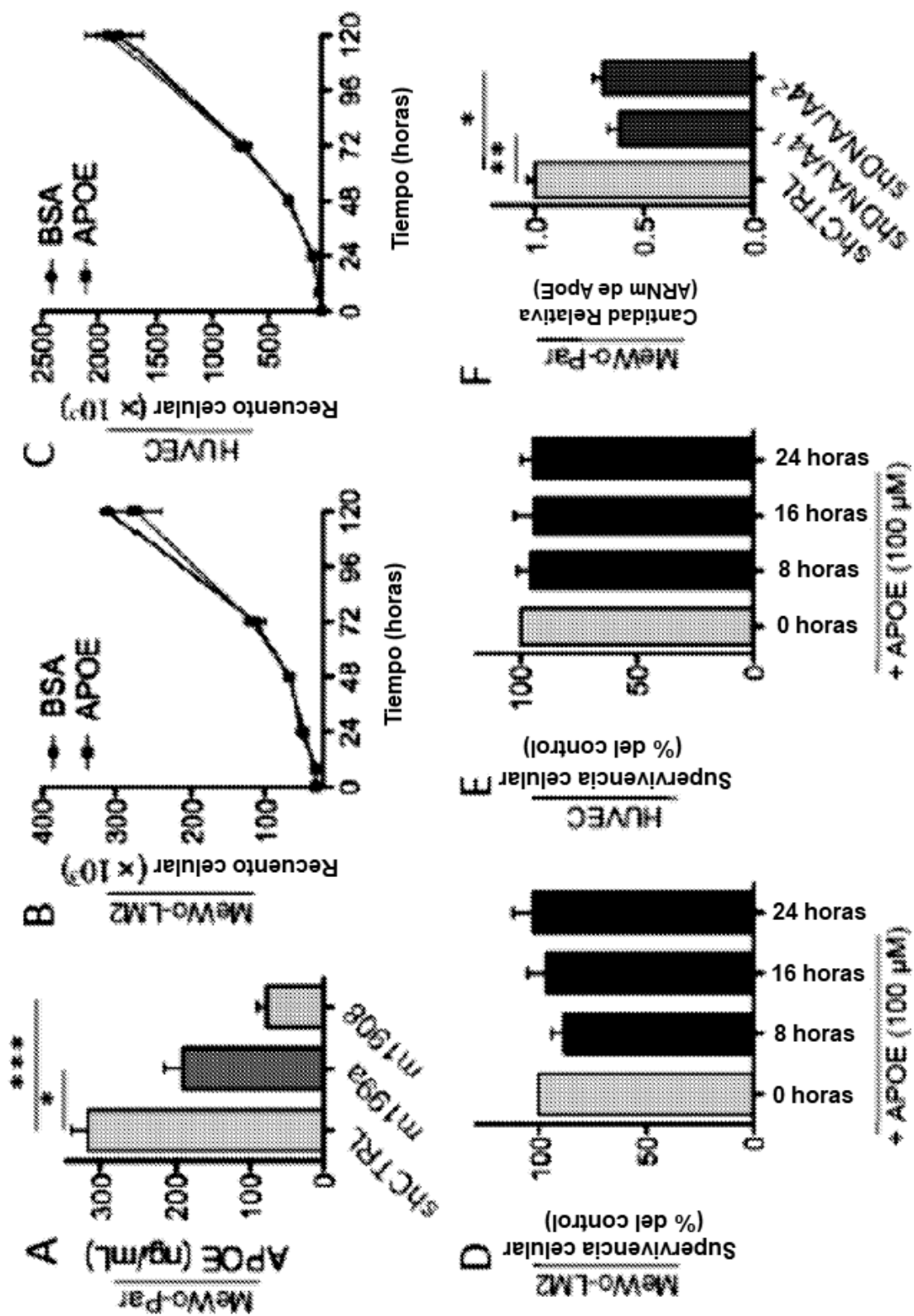
FIGURAS 14E-G



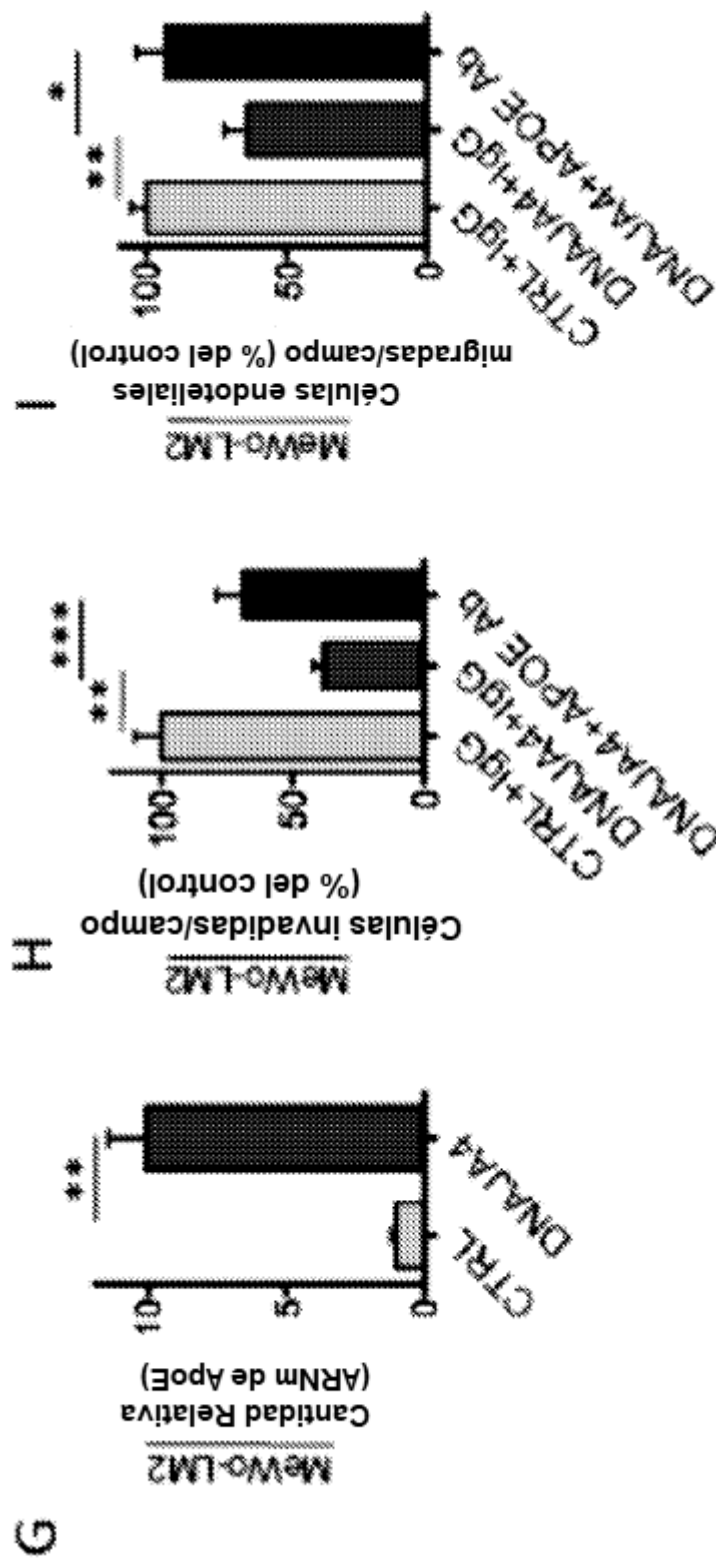
FIGURAS 15A-G



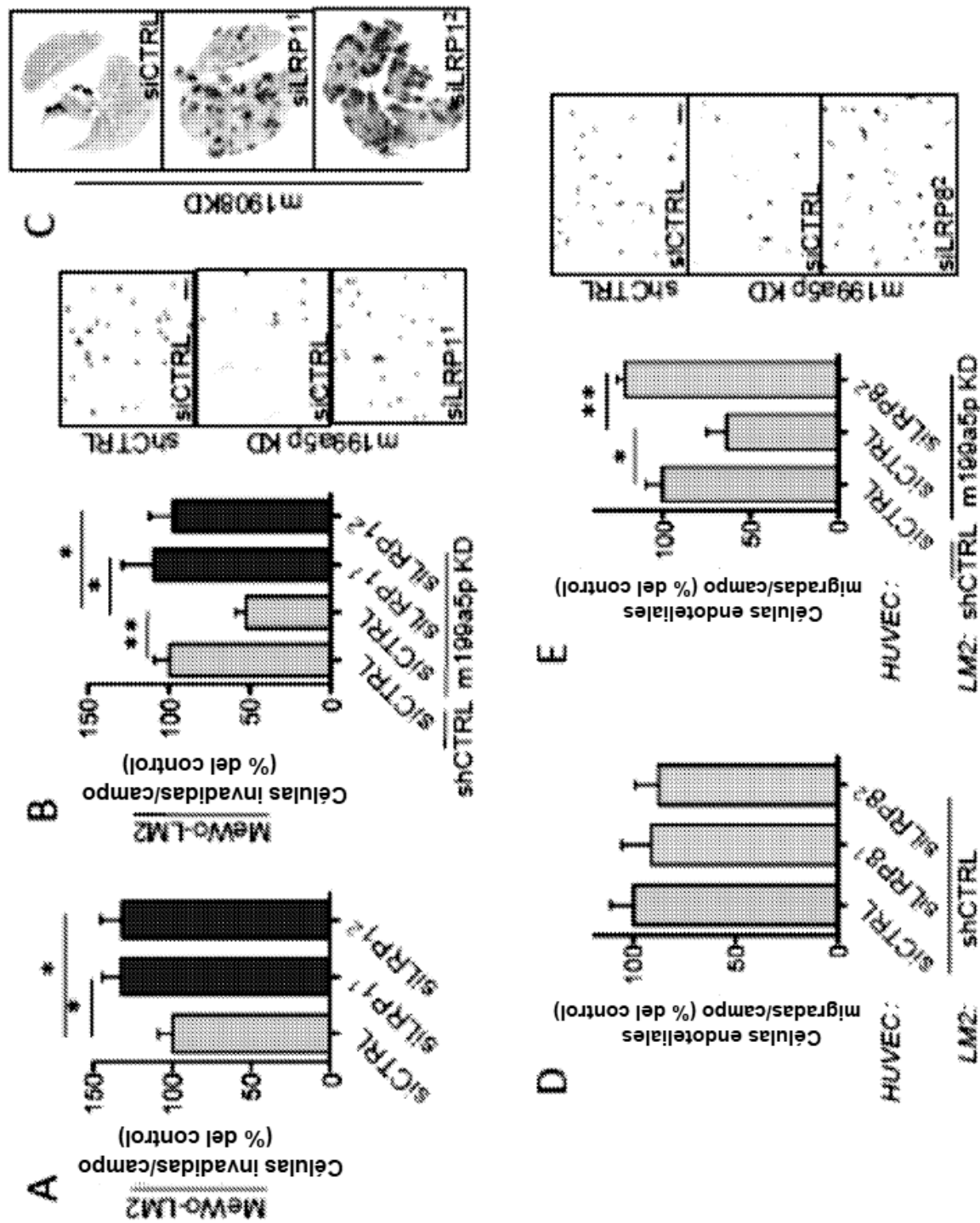
FIGURAS 15H-K



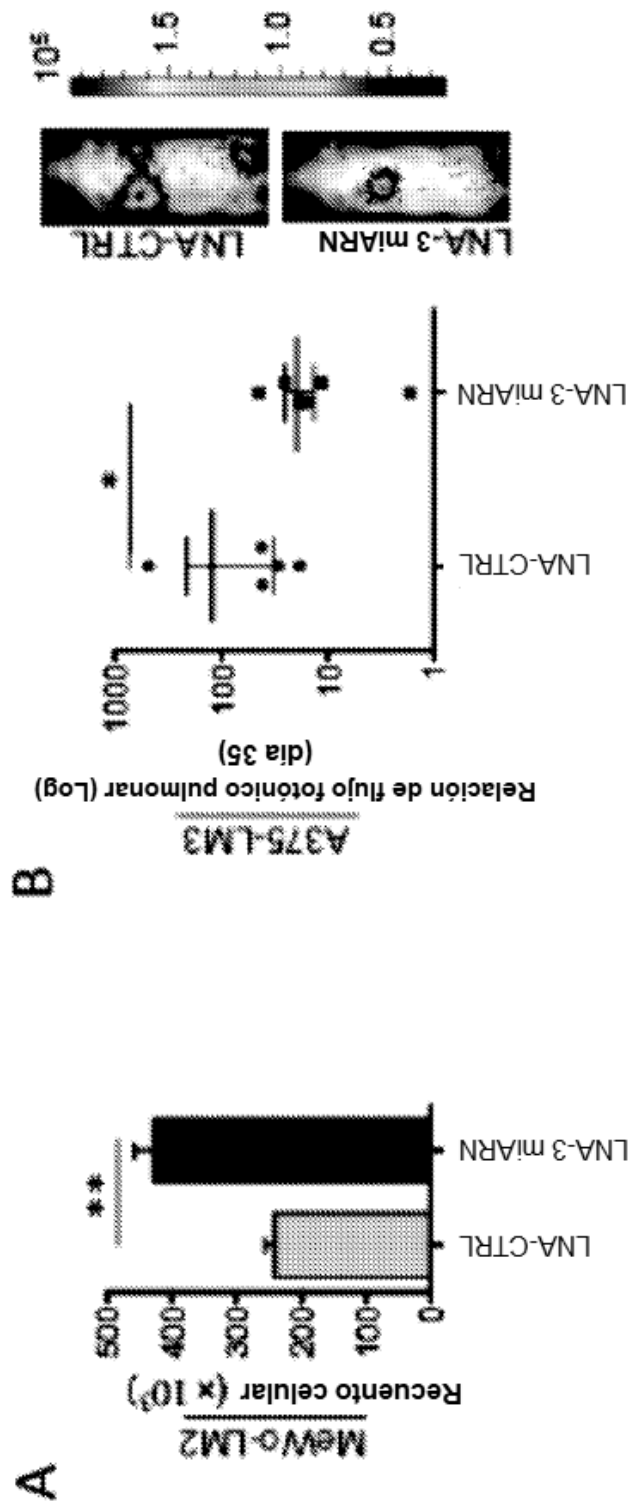
FIGURAS 16A-F



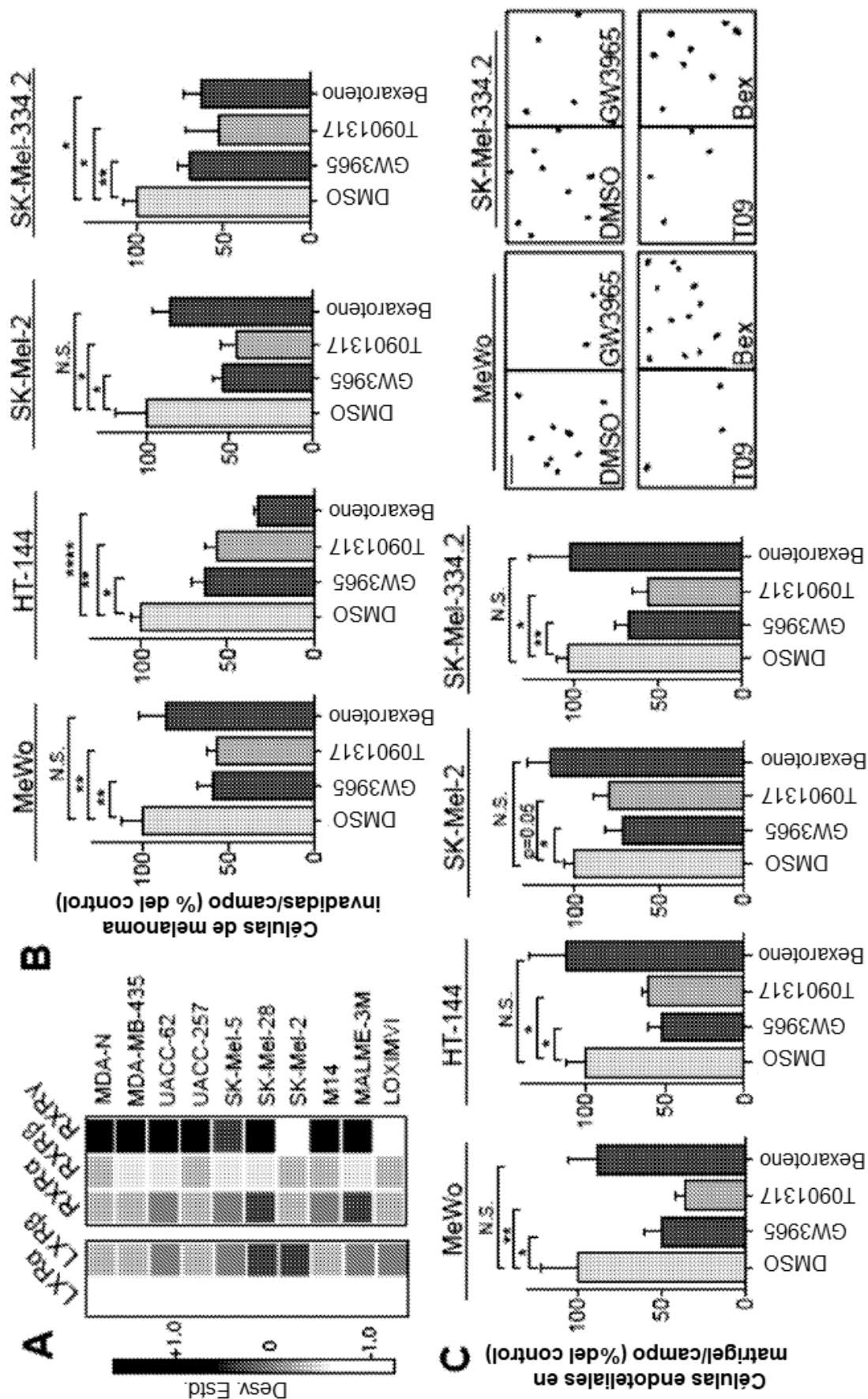
FIGURAS 16G-I



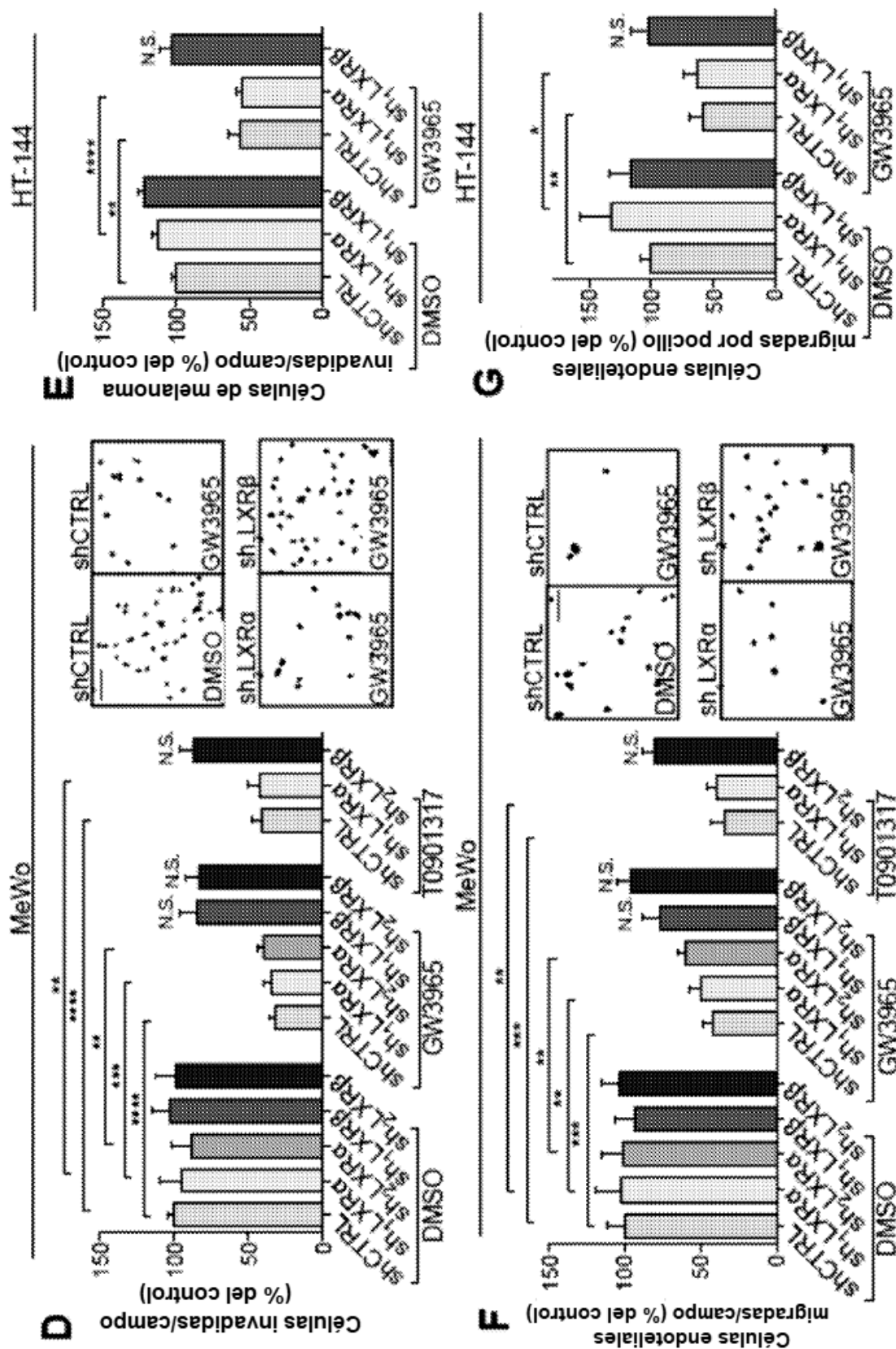
FIGURAS 17A-E



FIGURAS 18A-C



FIGURAS 19A-C



FIGURAS 19D-F

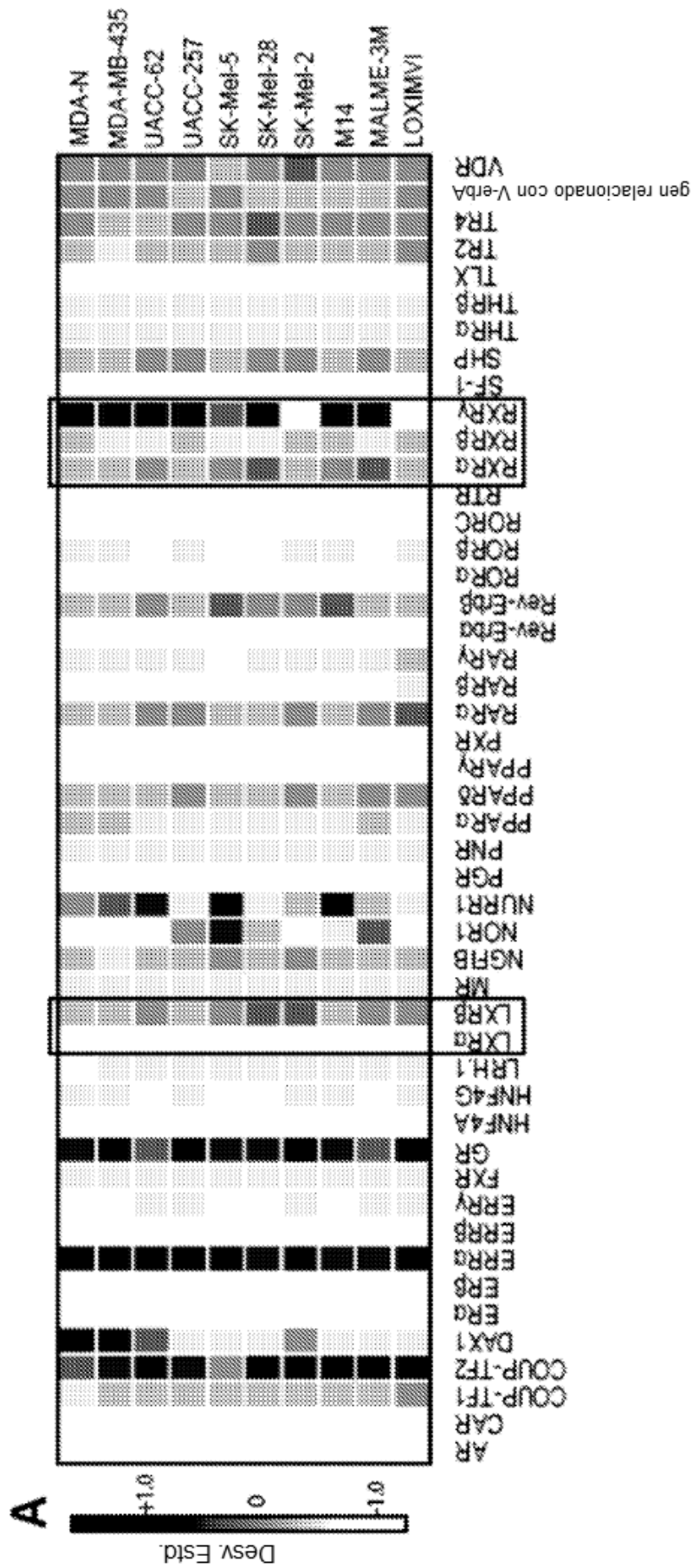
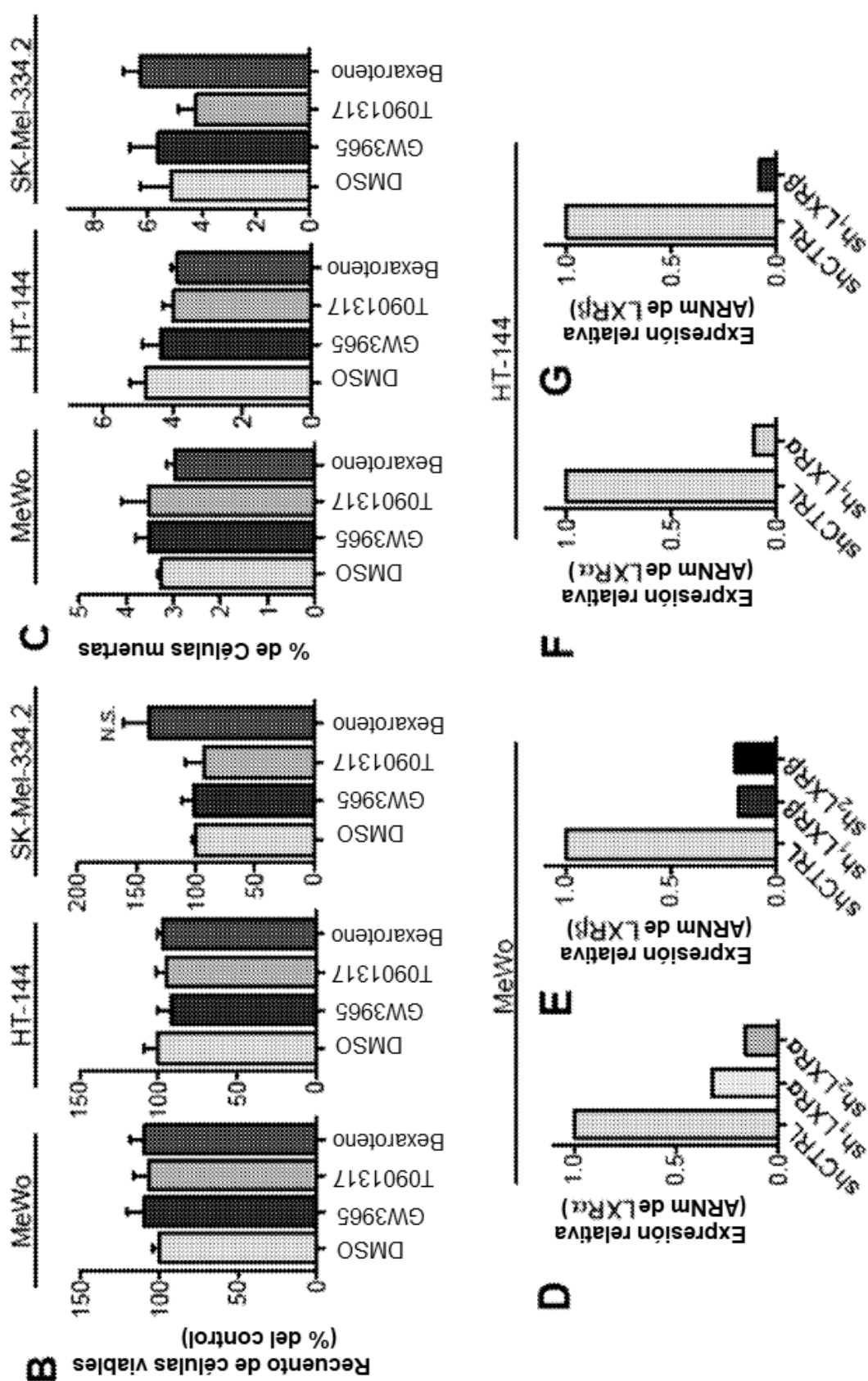
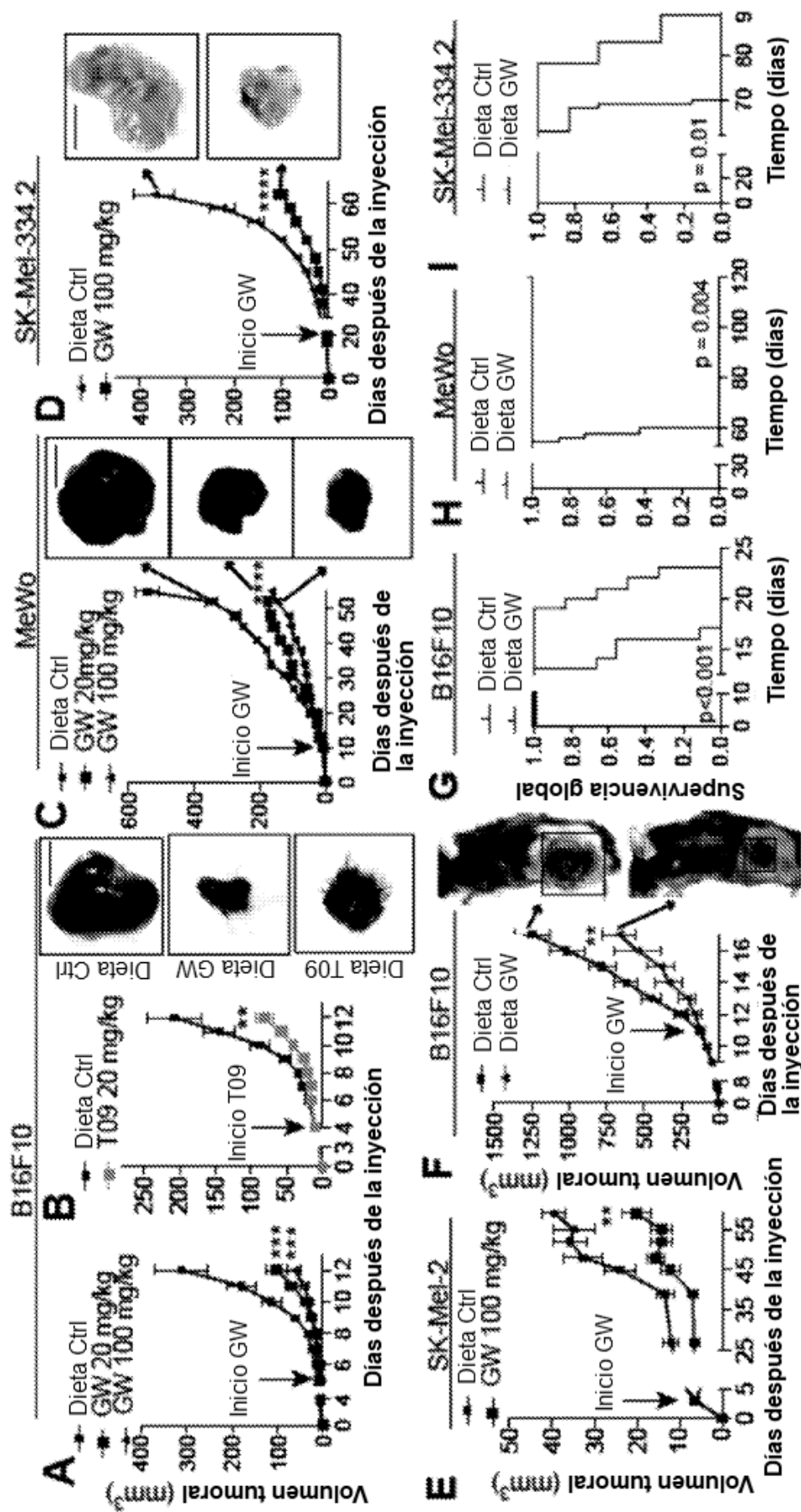


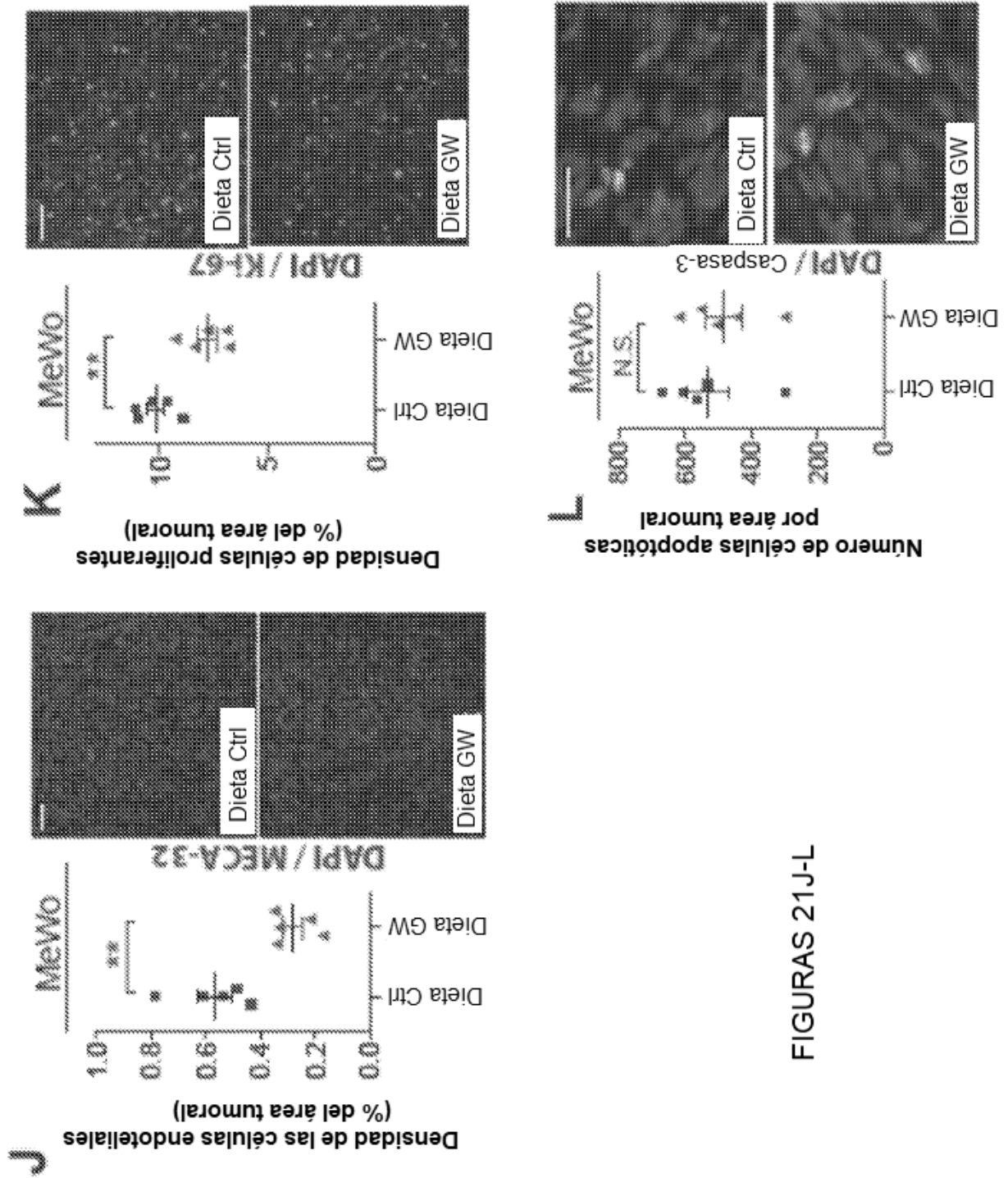
FIGURA 20A



FIGURAS 20B-G



FIGURAS 21A-I



FIGURAS 21J-L

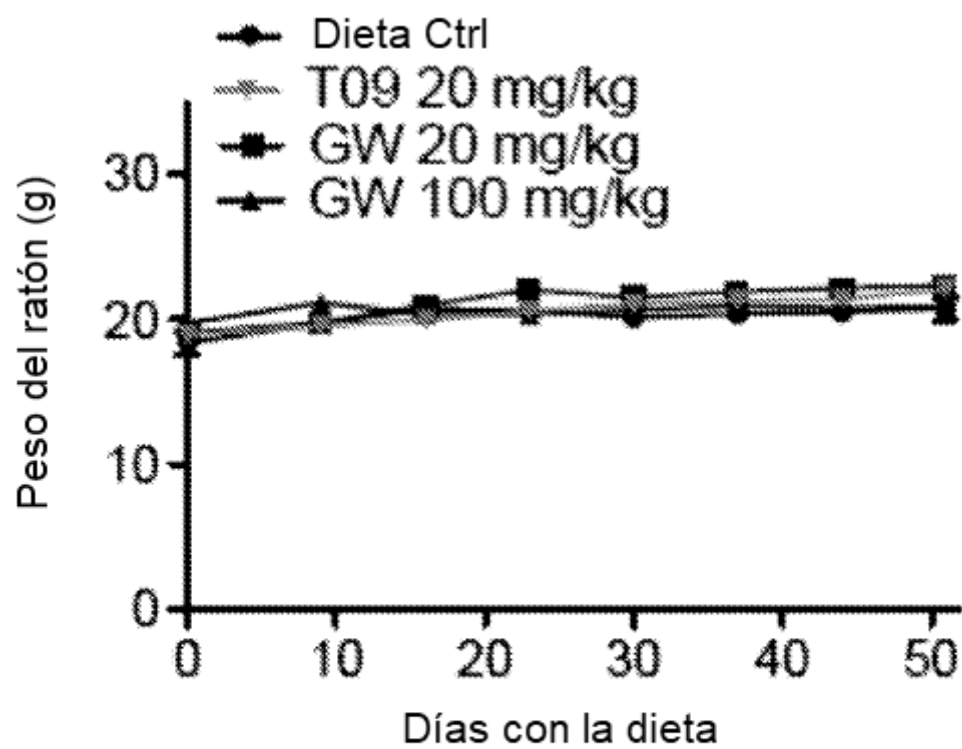
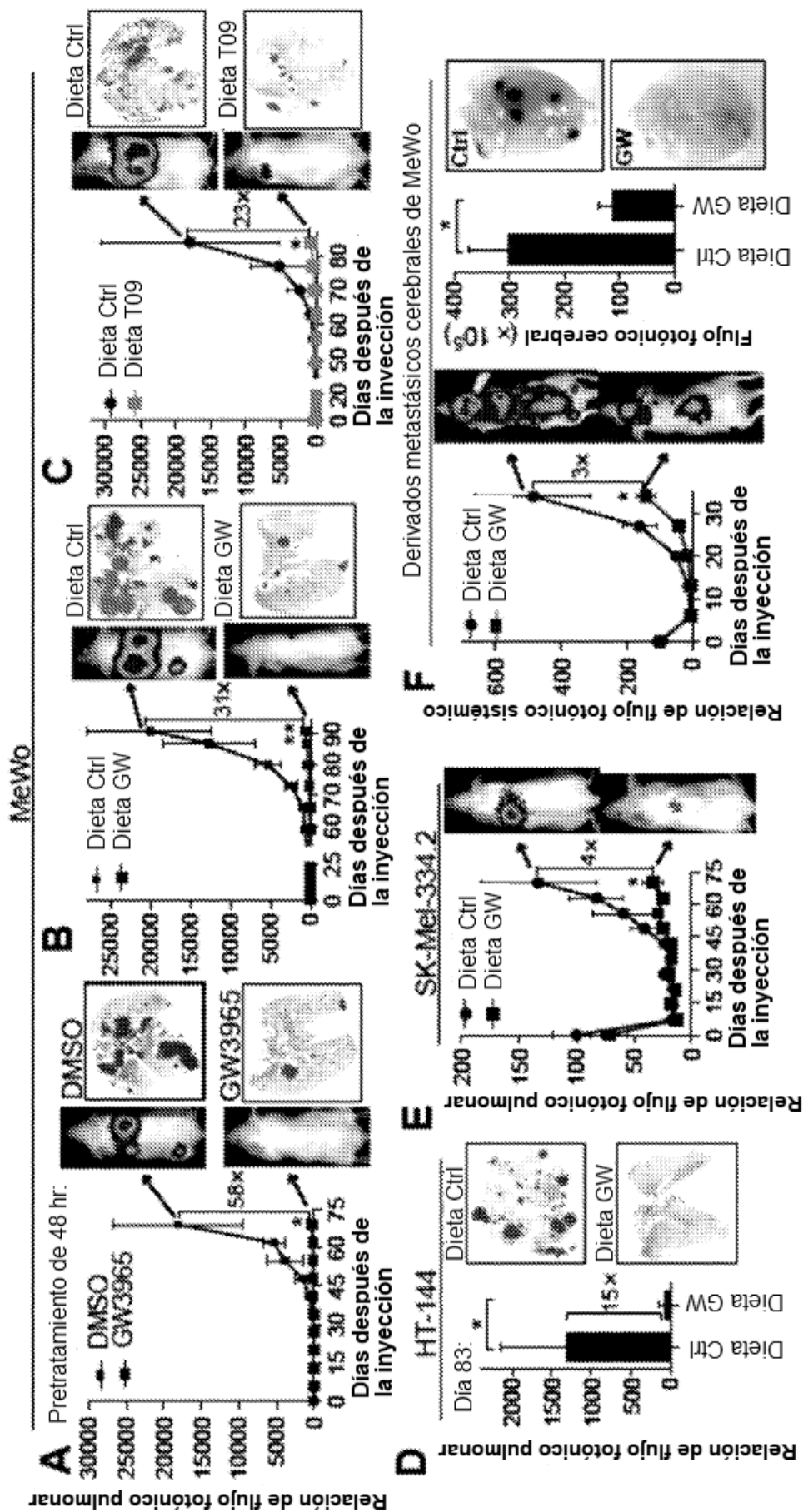
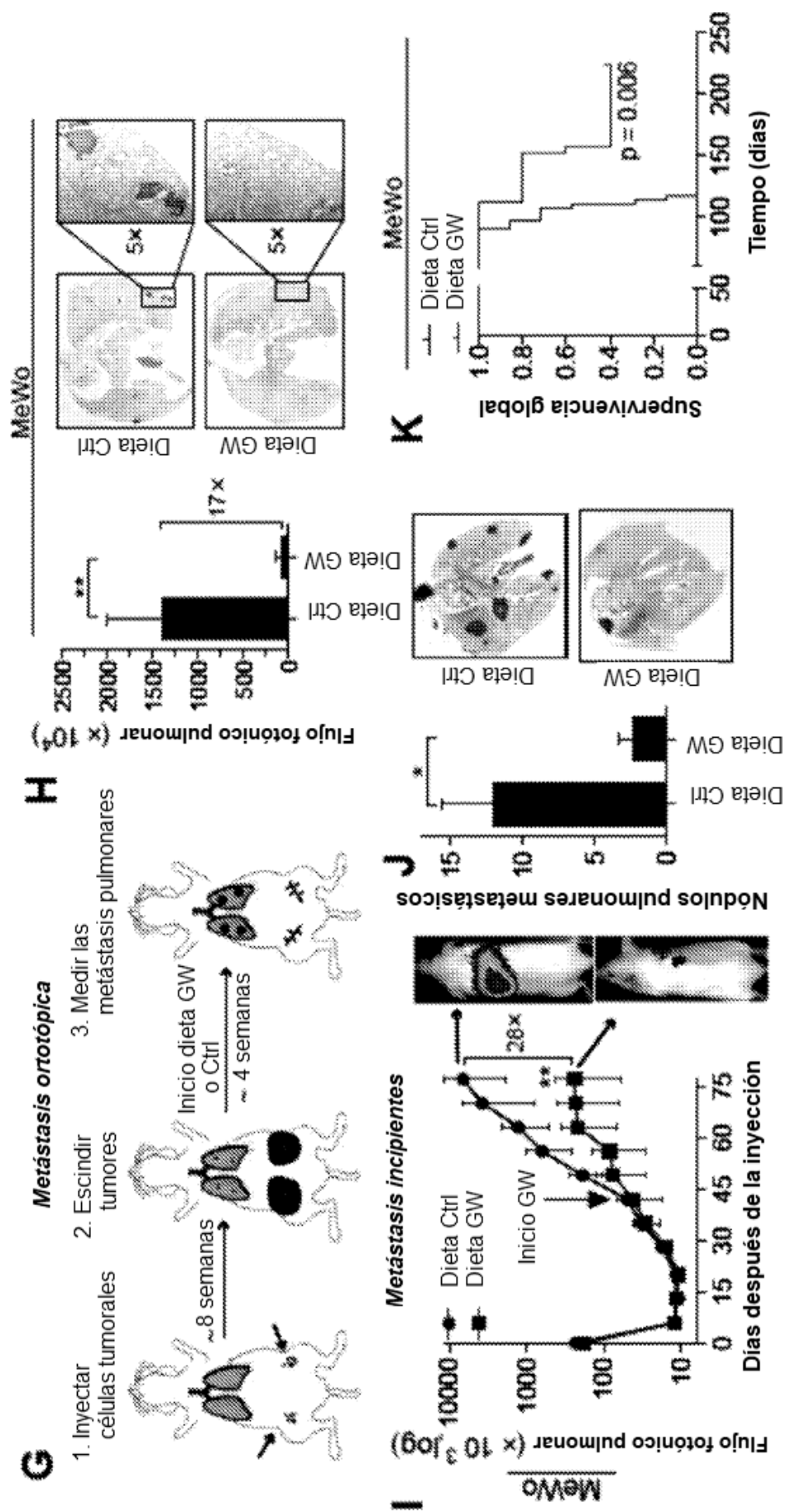


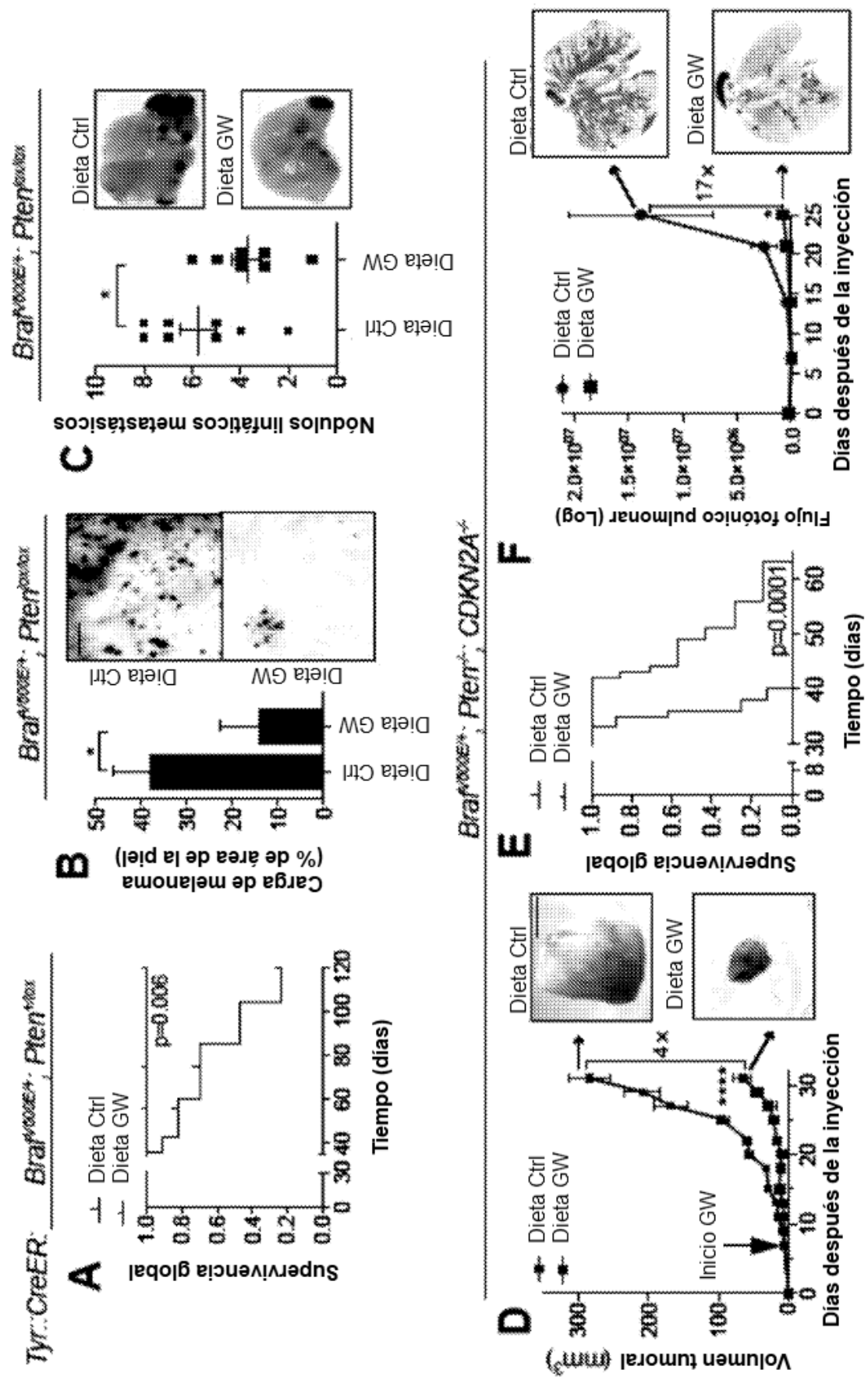
FIGURA 22



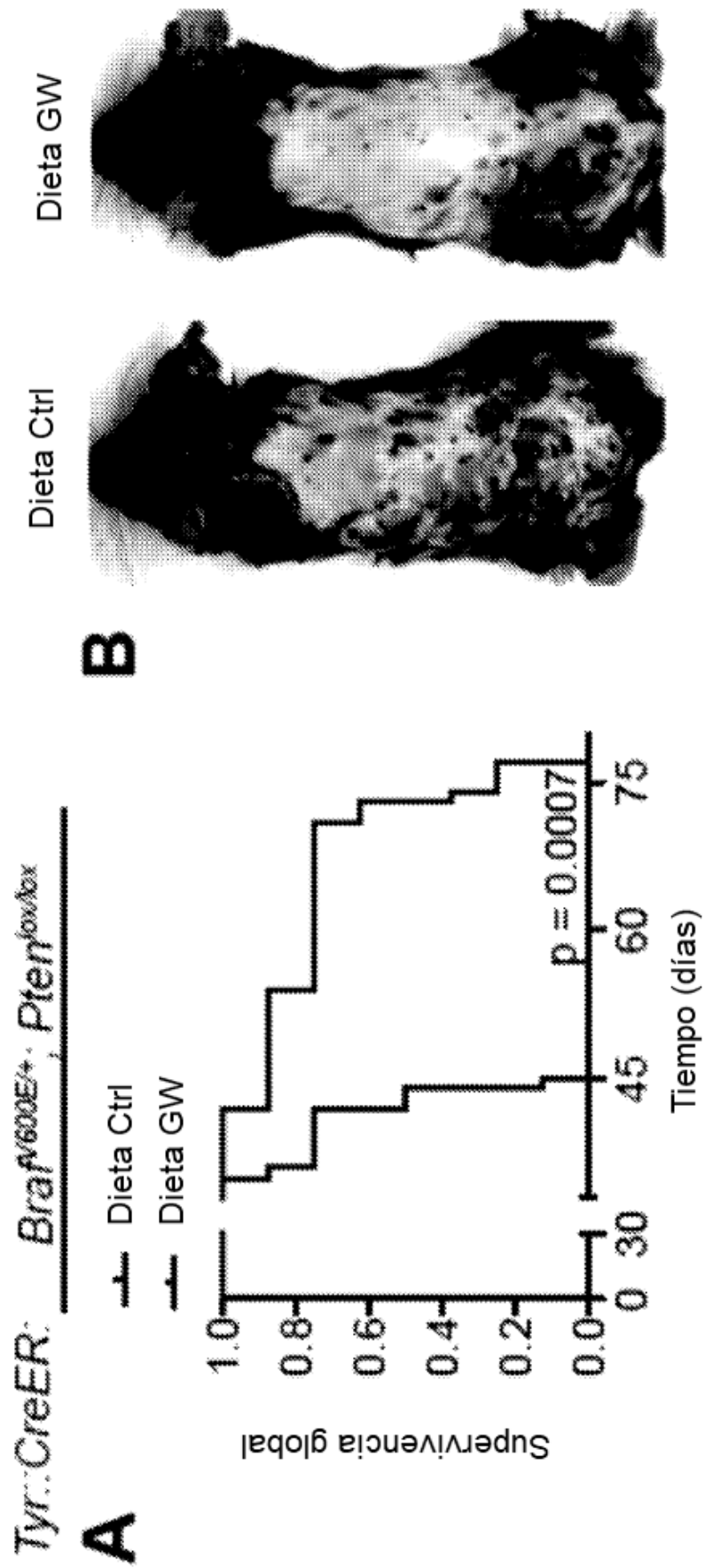
FIGURAS 23A-F



FIGURAS 23G-K



FIGURAS 24A-F



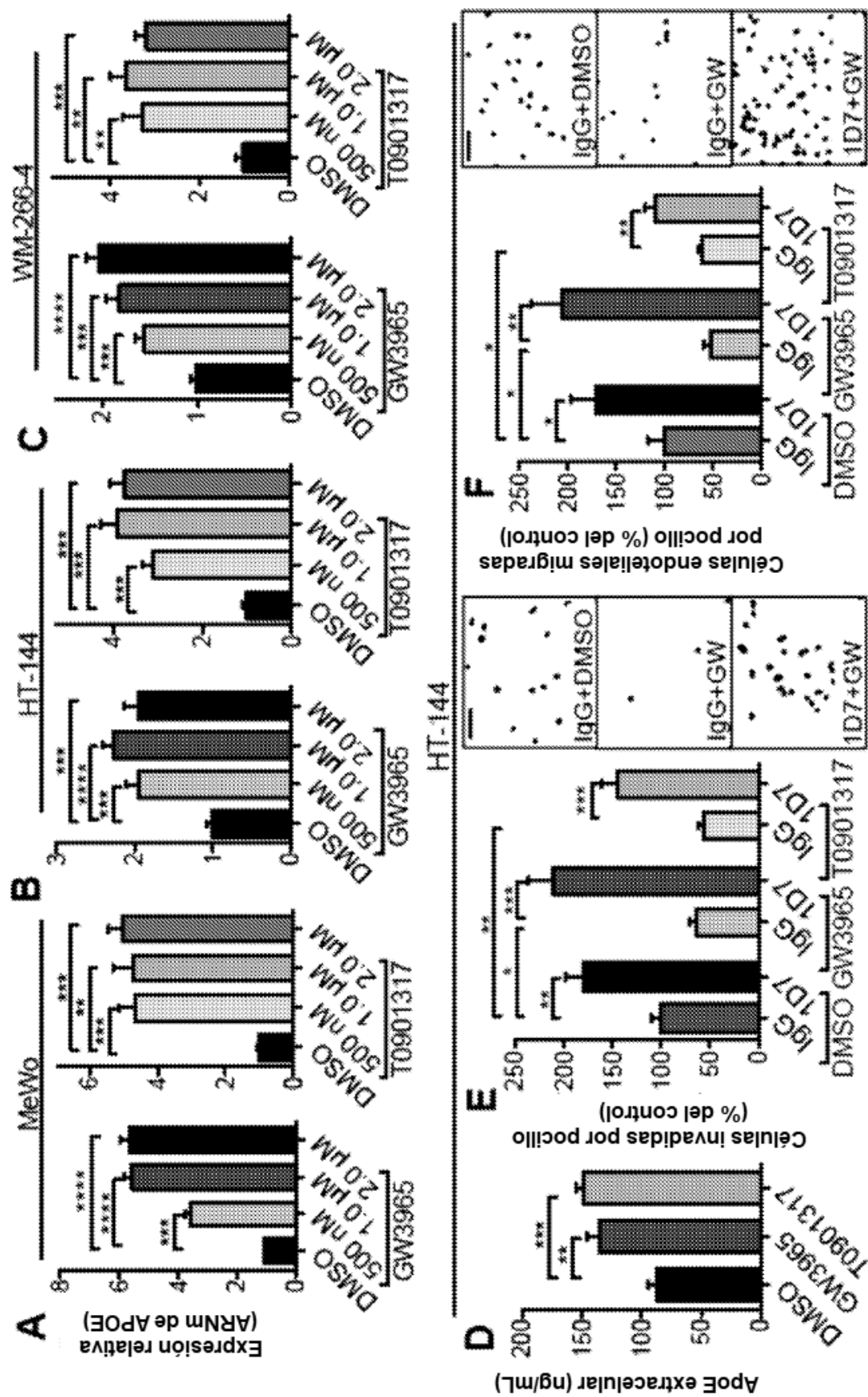
FIGURAS 25A-B

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	CEACAM1	1.83	5.58E-06	26
SREBF1	8.08	9.12E-15	2	LDLR	1.79	1.29E-05	27
FABP7	7.43	1.85E-11	3	IL1RAPL1	1.78	1.58E-09	28
LOC645313	4.34	2.25E-10	4	PPP1R3C	1.78	1.64E-07	29
APOE	4.11	1.04E-07	5	ABCD1	1.76	4.24E-07	30
KRT34	4.09	5.99E-18	6	C10ORF75	1.67	2.91E-06	31
FASN	3.72	2.48E-07	7	LSS	1.66	1.86E-05	32
IGFBP5	2.91	1.15E-13	8	DHCR7	1.64	2.58E-06	33
TF	2.88	2.37E-12	9	CAPS	1.63	8.35E-06	34
INSIG1	2.62	3.15E-16	10	PCYT2	1.63	3.08E-06	35
MYLIP	2.56	9.21E-07	11	C5ORF28	1.62	3.71E-02	36
LPCAT3	2.54	2.80E-15	12	TMEM119	1.60	1.15E-04	37
ACACA	2.43	1.56E-12	13	LPXN	1.60	1.15E-07	38
SCD	2.42	3.56E-08	14	SMPDL3A	1.59	2.39E-04	39
FCRLA	2.19	9.13E-09	15	SPOCD1	1.58	7.18E-07	40
FADS1	2.12	2.01E-09	16	ACLY	1.58	6.56E-11	41
ACSS2	2.02	1.88E-08	17	VGLL3	1.57	1.32E-04	42
SLC2A6	2.02	5.99E-18	18	MVD	1.57	1.13E-03	43
ACSL3	1.94	5.35E-10	19	NAV3	1.55	2.32E-04	44
TMEM135	1.91	9.06E-07	20	HS.538962	1.55	1.40E-07	45
ADM	1.88	3.78E-05	21	TUBB2B	1.53	3.46E-08	46
LPIN1	1.88	5.94E-08	22	LOC728285	1.53	2.19E-06	47
MID1IP1	1.85	7.48E-09	23	PHLDA2	1.52	2.77E-07	48
FDPS	1.84	5.49E-05	24	APOLD1	1.51	9.50E-05	49
CCL2	1.83	1.00E-08	25	BEX1	1.51	1.08E-09	50

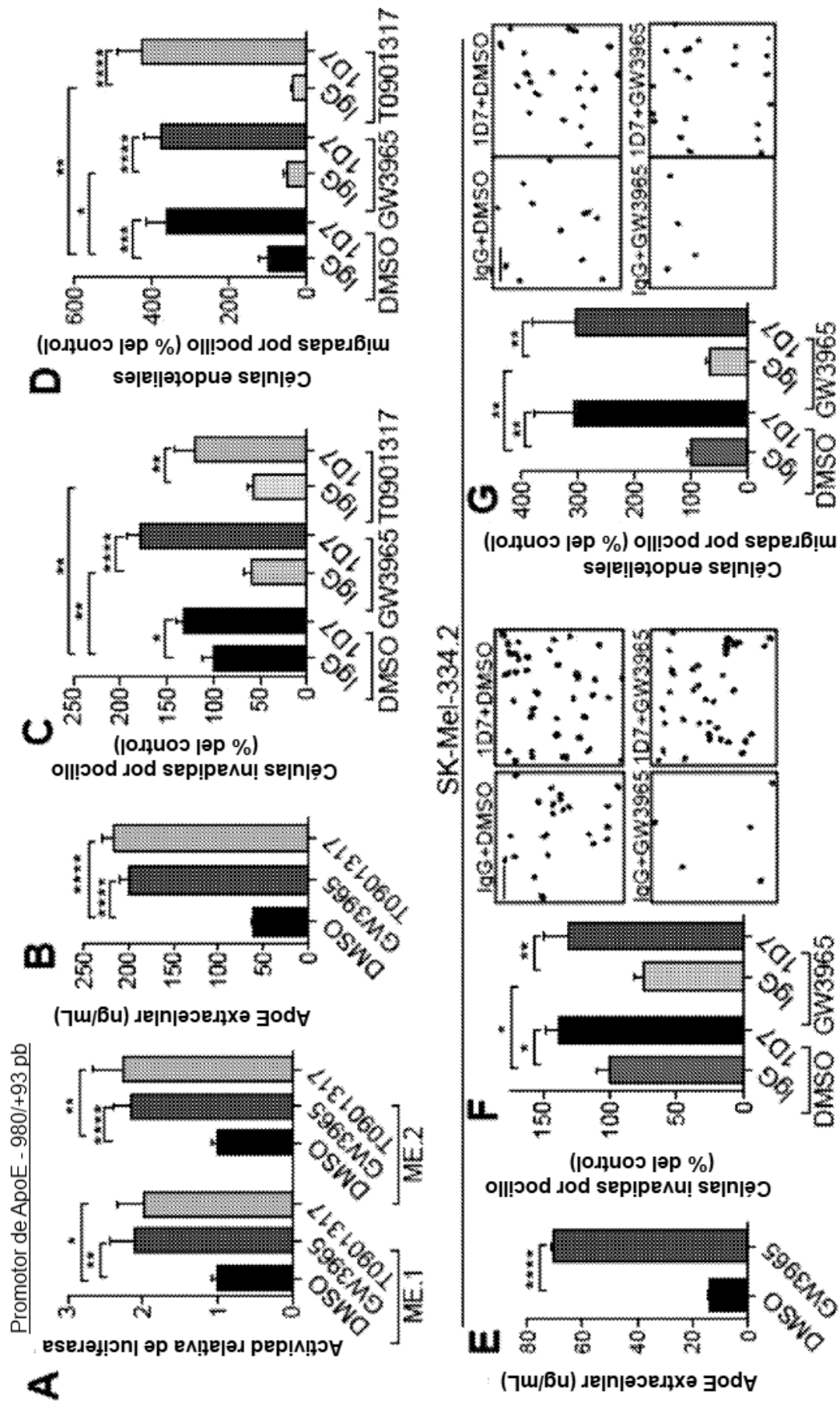
* Veces de regulación al alza en expresión génica basada en matriz para el tratamiento con GW3965 (1 μ M, 48 hrs) frente al tratamiento control con DMSO

FIGURA 26

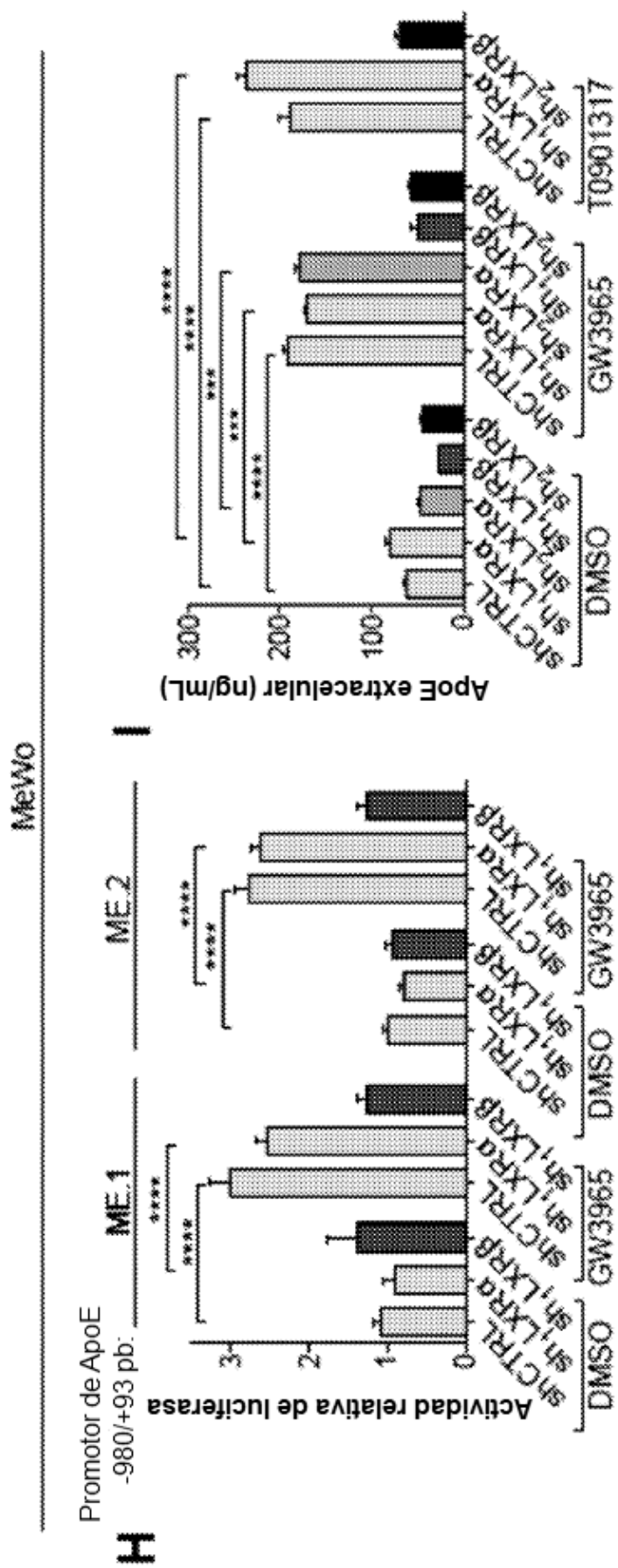


FIGURAS 27A-F

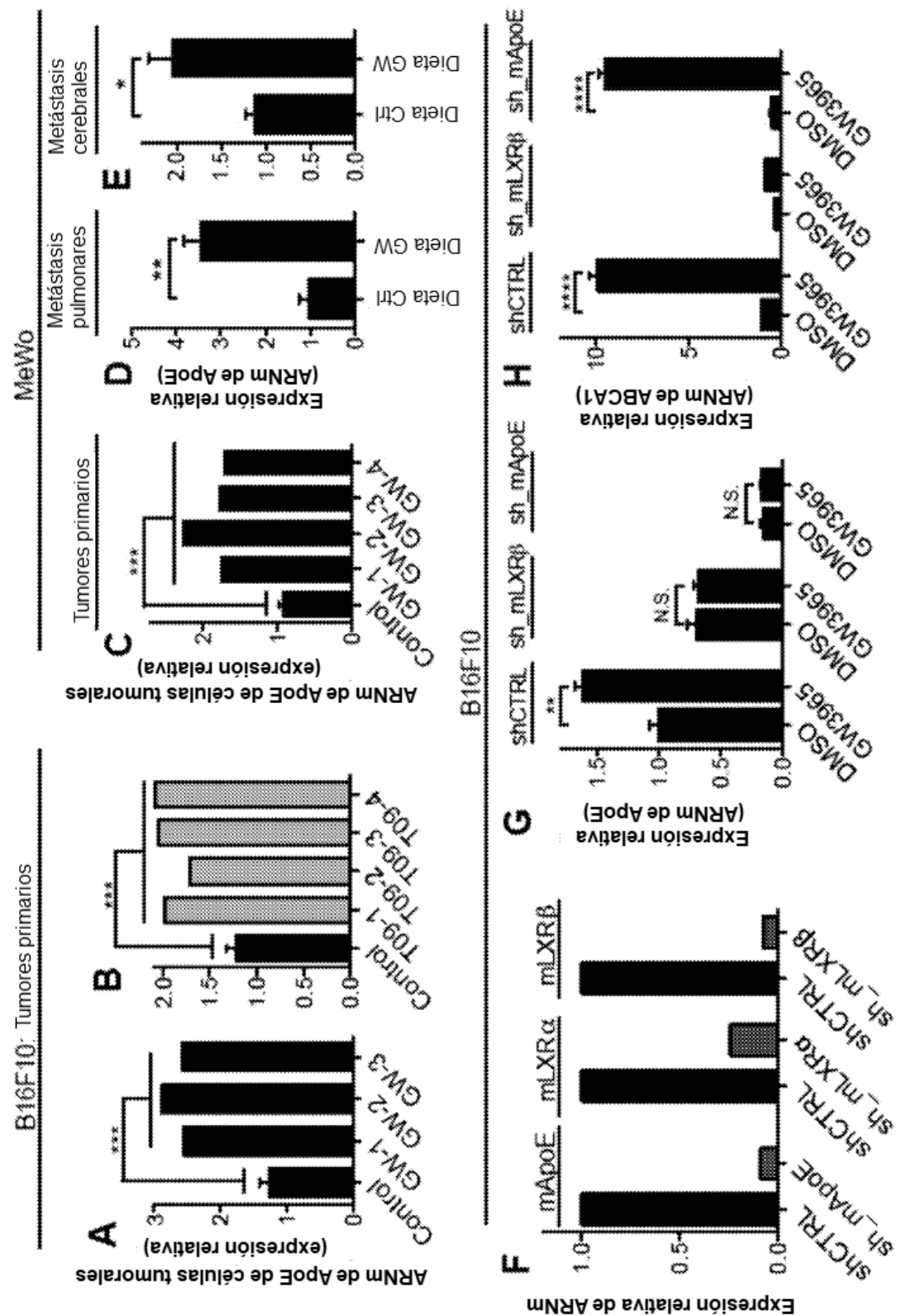




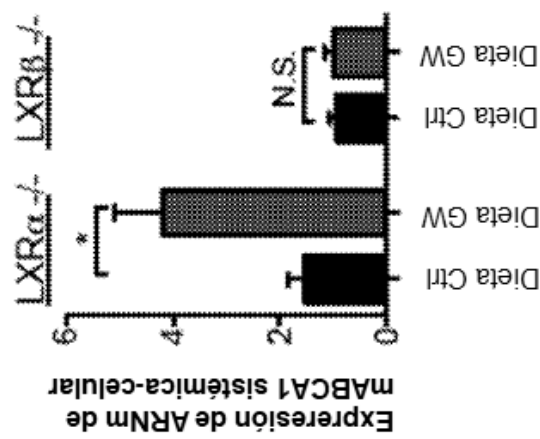
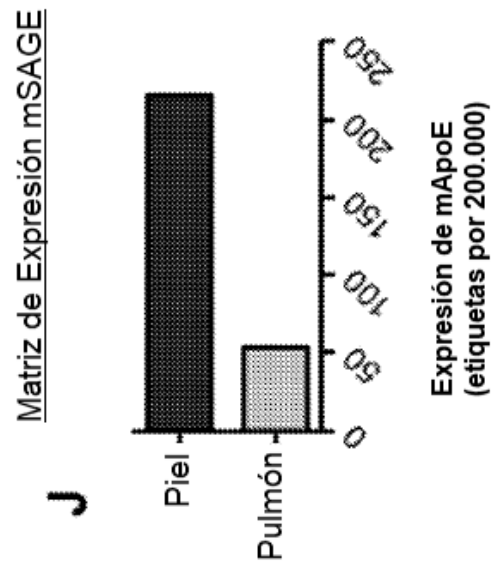
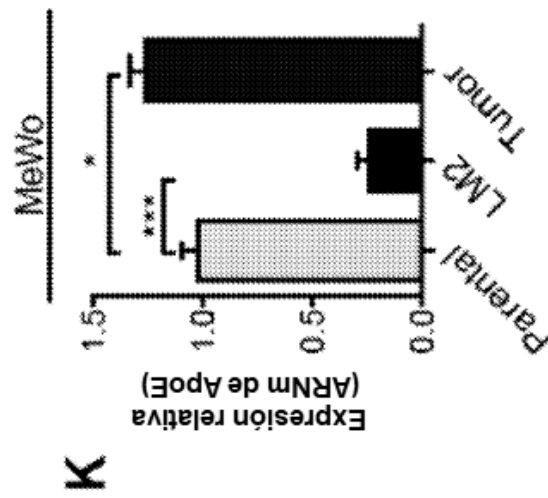
FIGURAS 28A-G



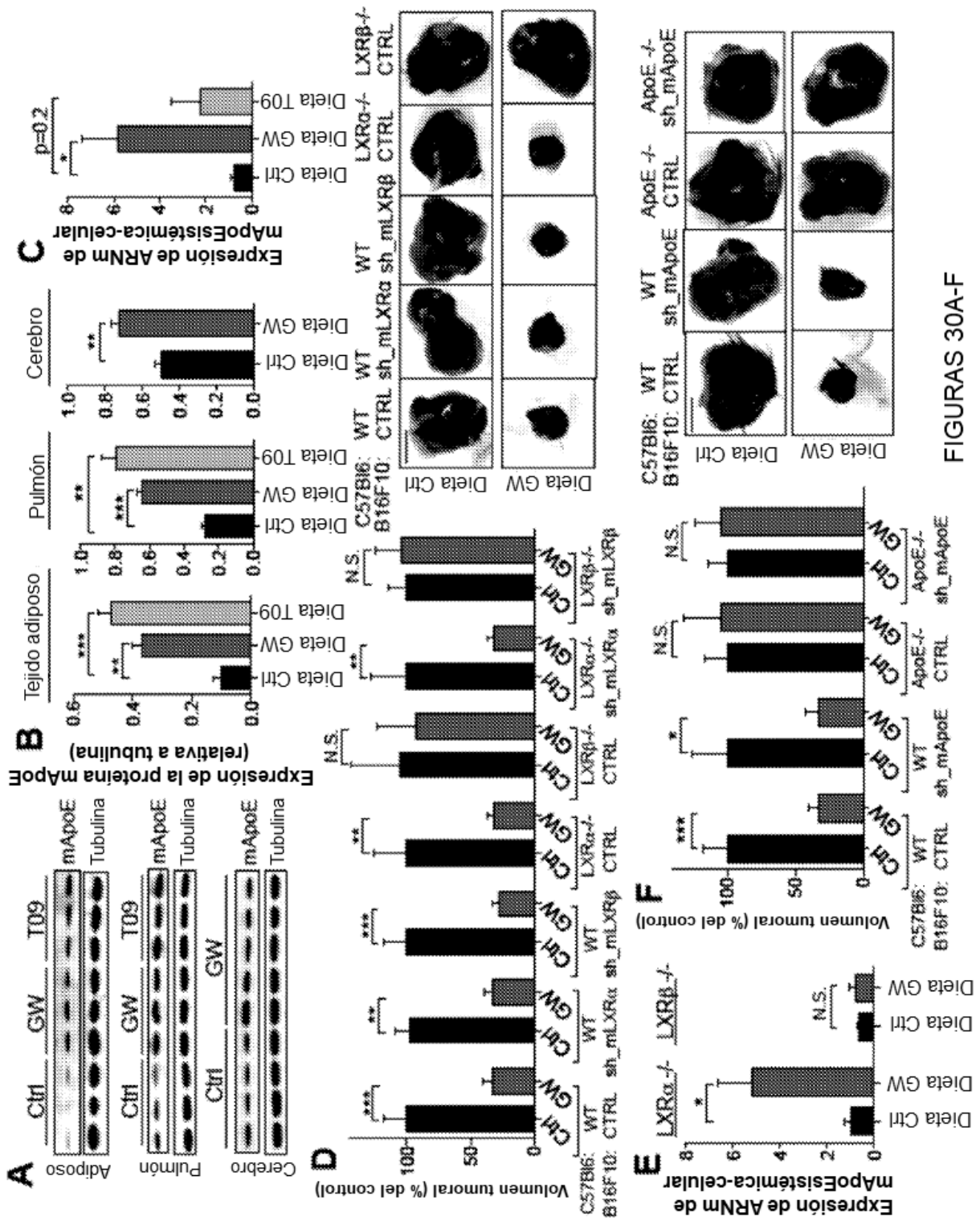
FIGURAS 28H-I

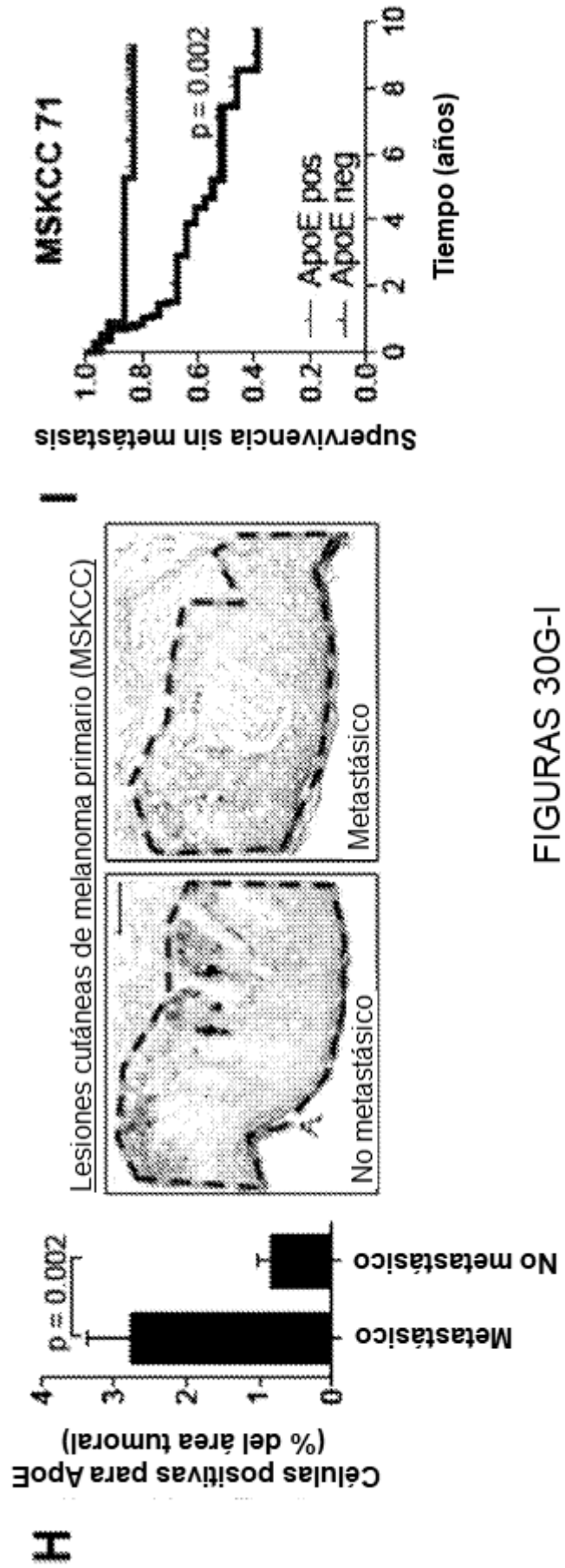
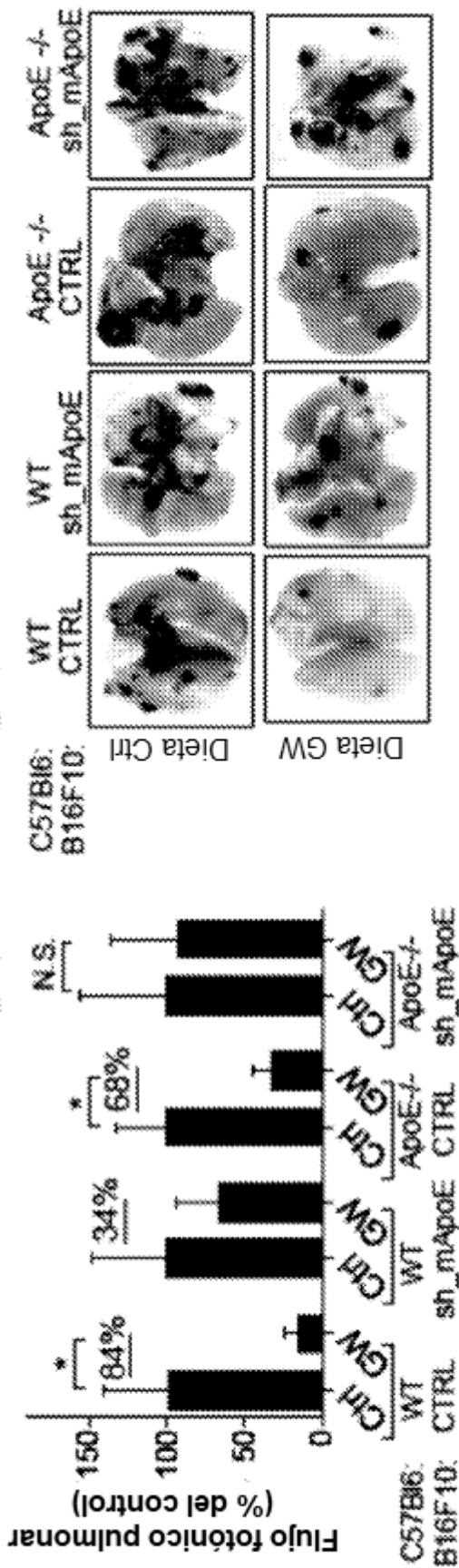


FIGURAS 29A-H

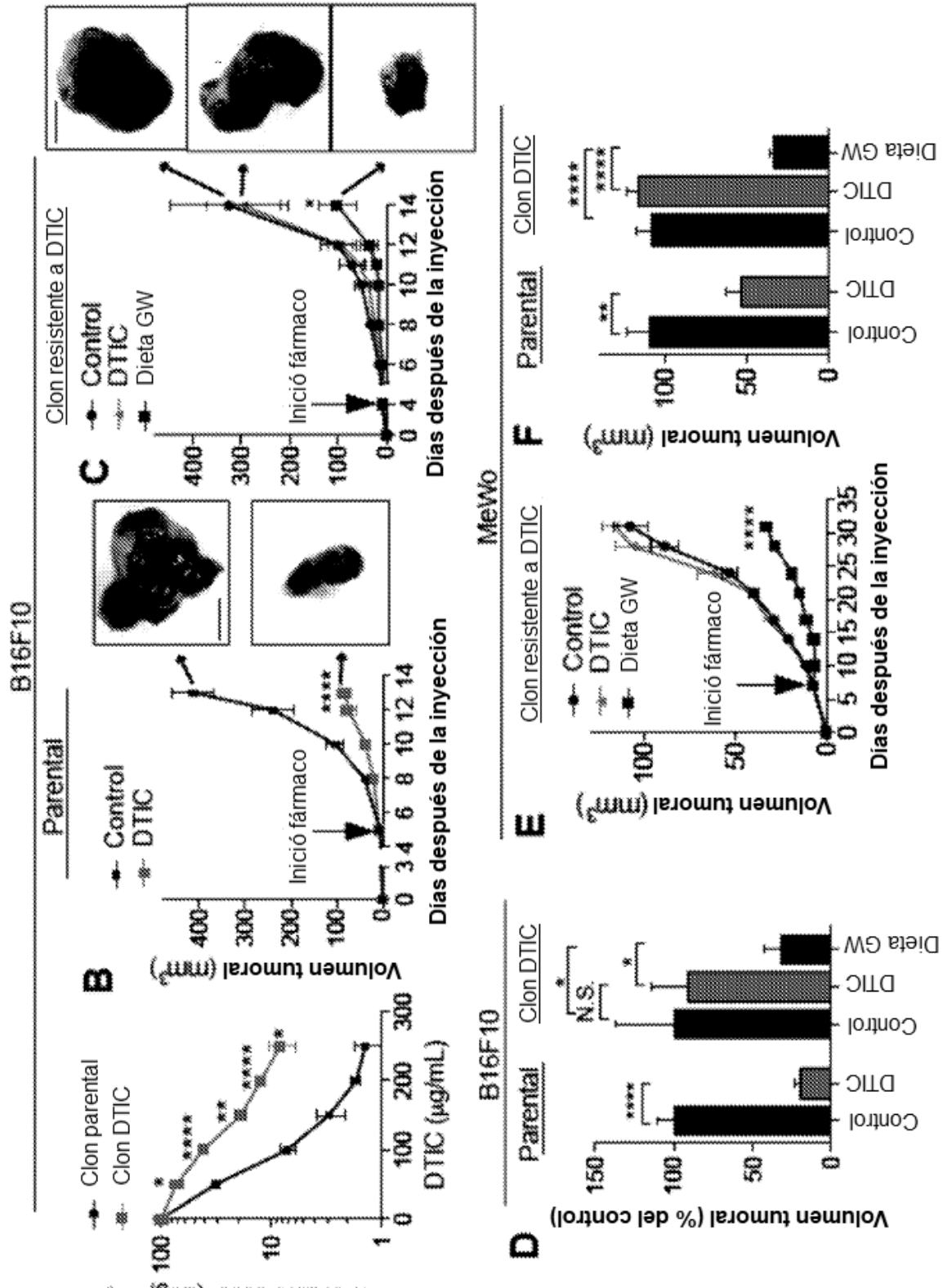


FIGURAS 29I-K

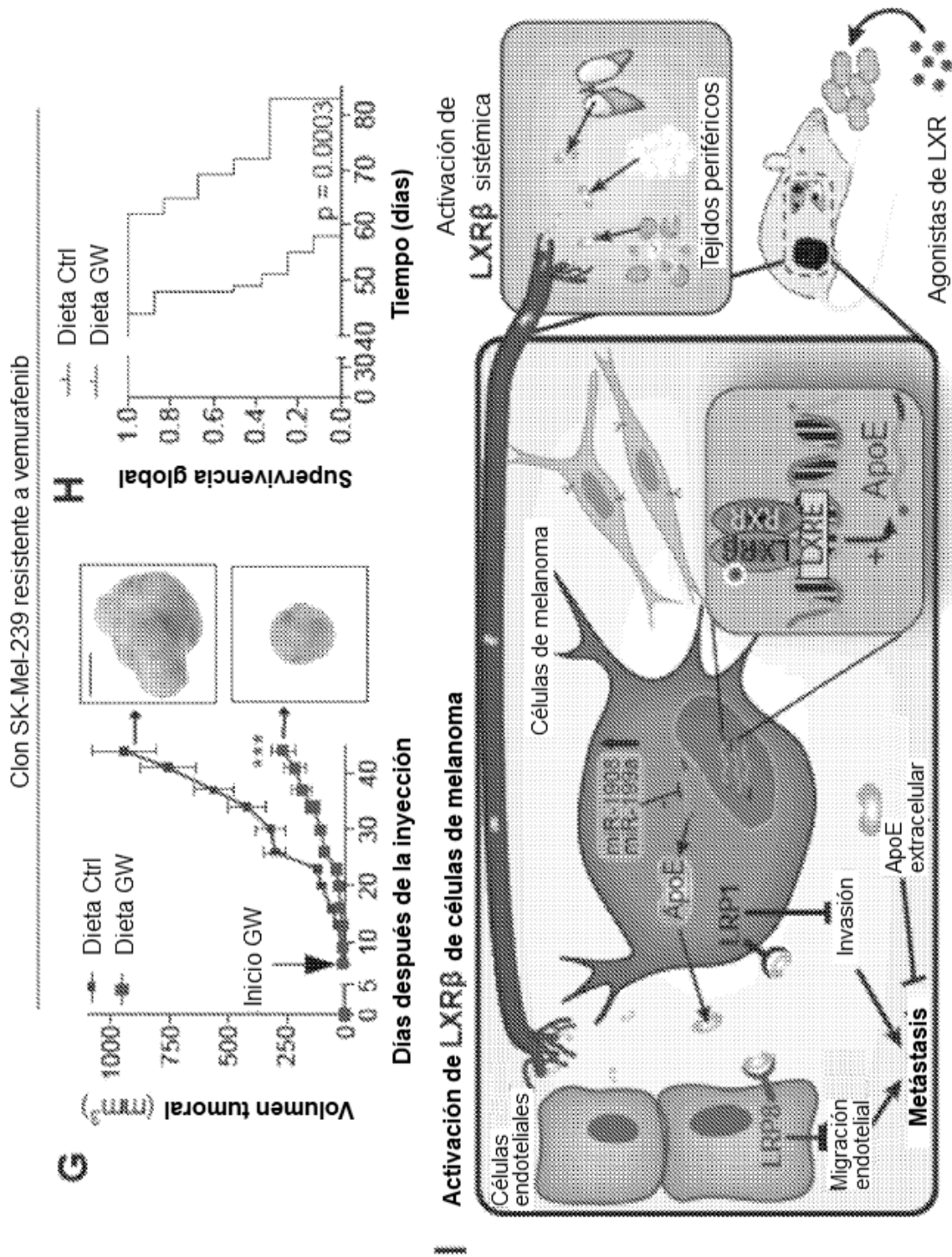




FIGURAS 30G-I



FIGURAS 31A-F



FIGURAS 31G-I

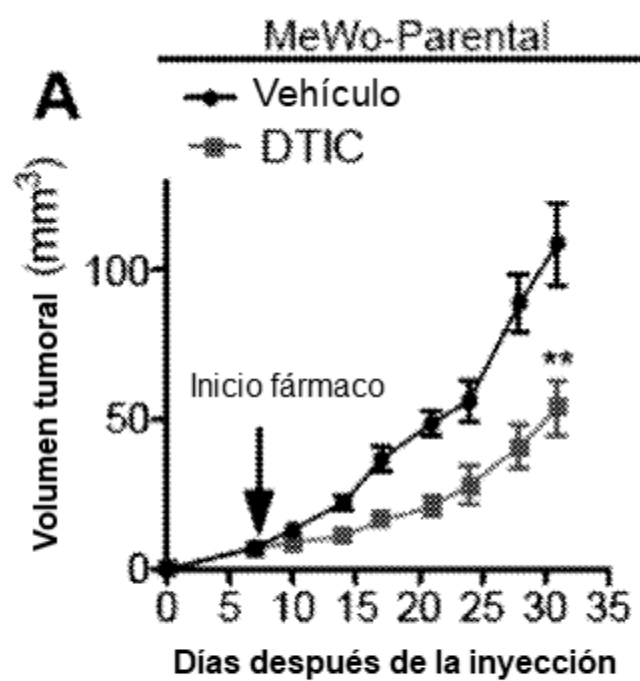
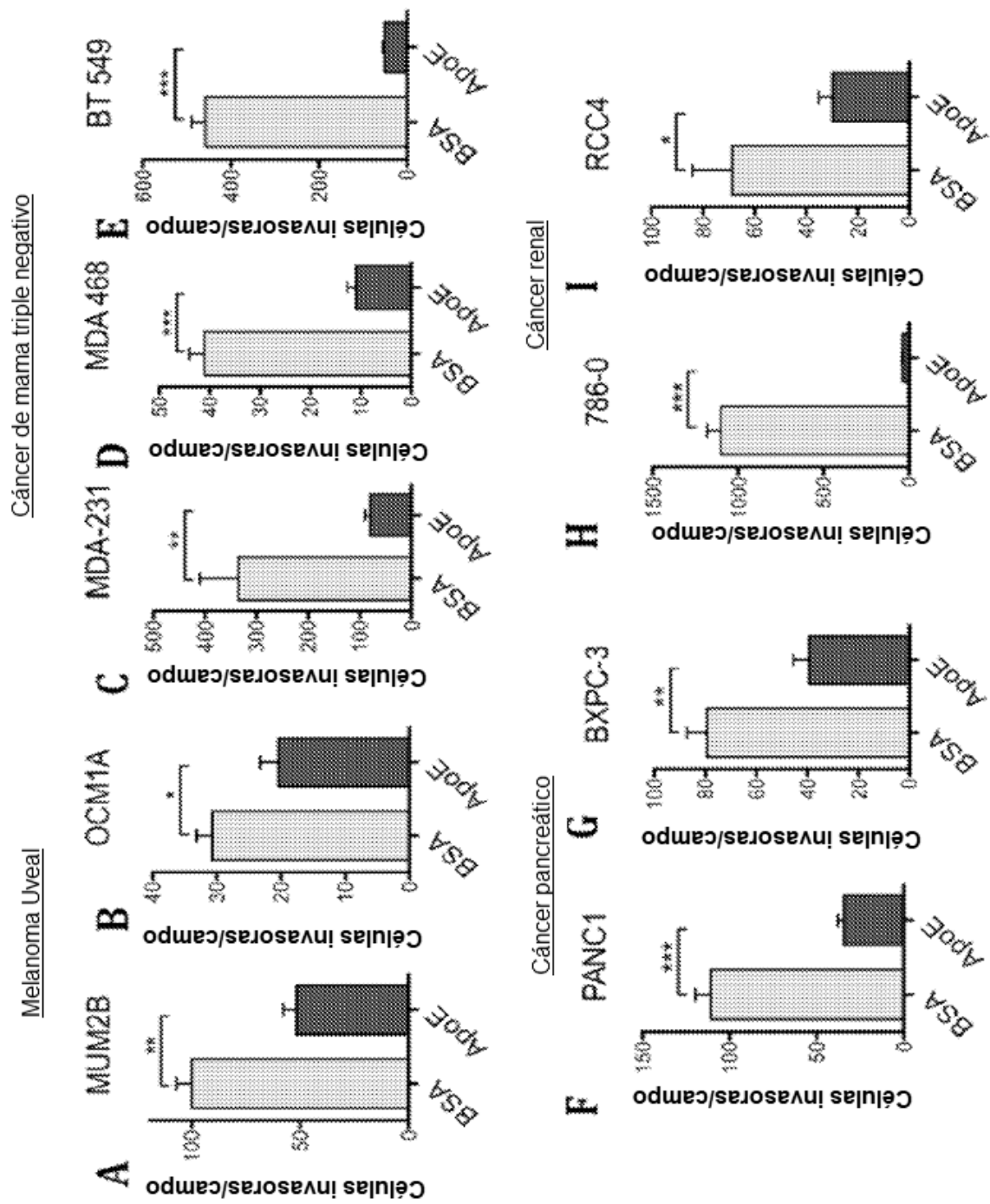
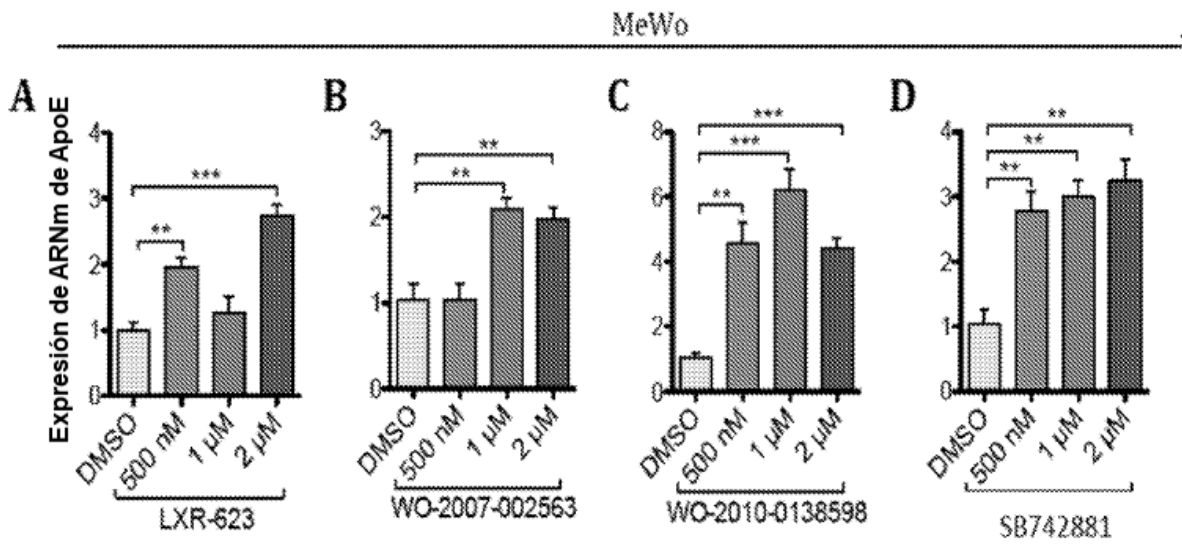


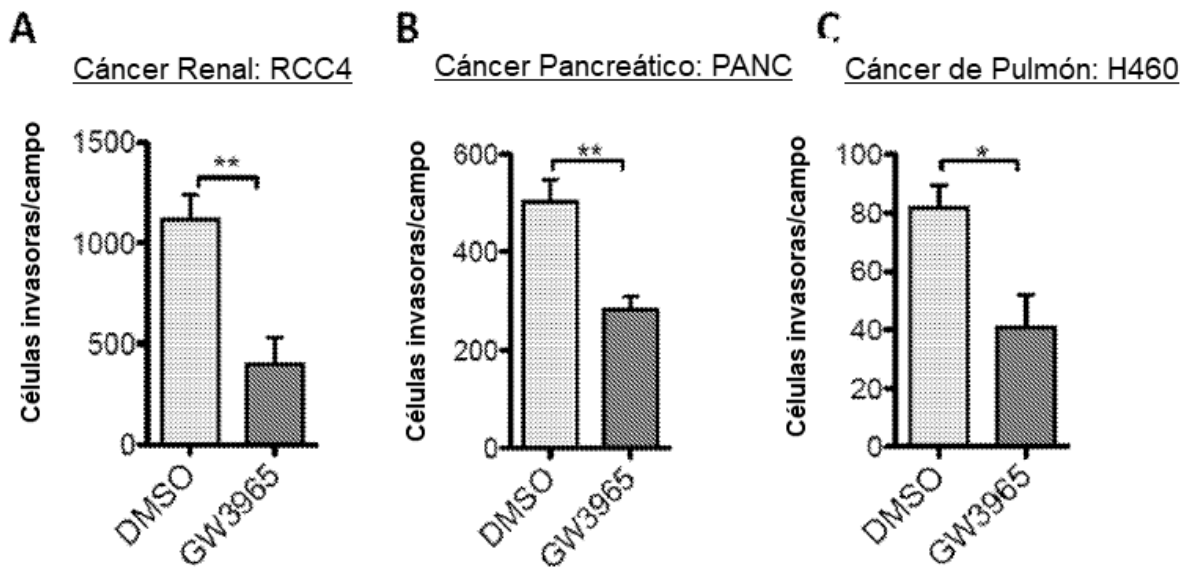
FIGURA 32



FIGURAS 33A-I



FIGURAS 34A-D



FIGURAS 35A-C

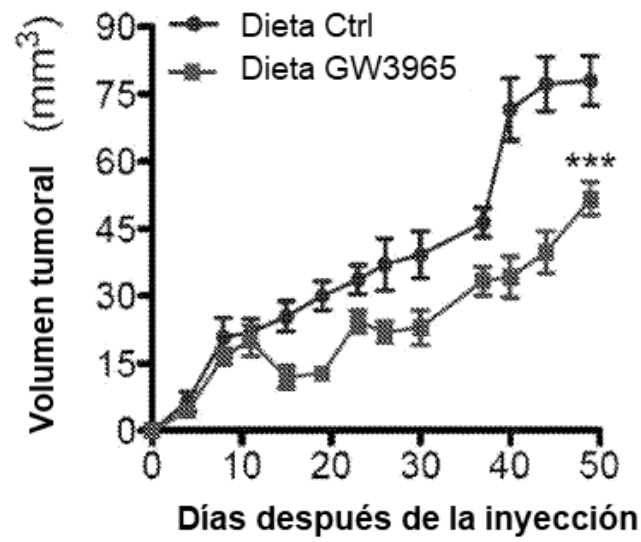
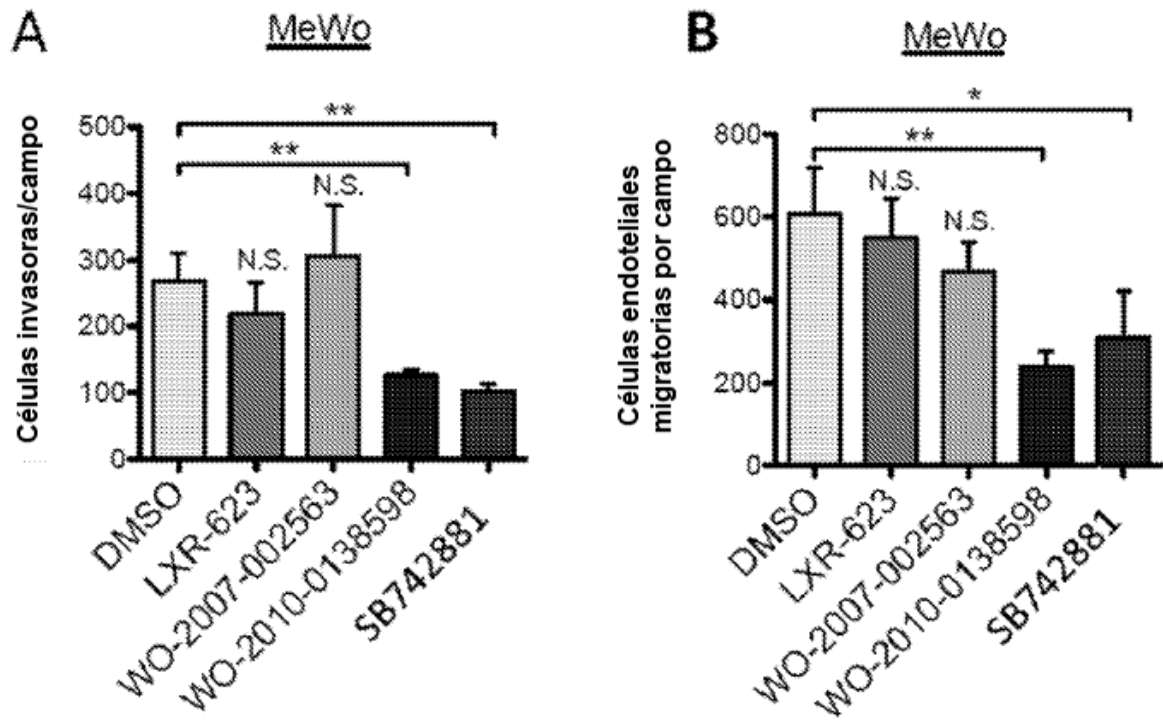


FIGURA 36



FIGURAS 37A-B

