

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 195**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2004** **E 04795359 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 1677734**

54 Título: **Cistatina C como antagonista de TGF-B y métodos relacionados con la misma**

30 Prioridad:

15.10.2003 US 511794 P

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

06.07.2016

73 Titular/es:

**NATIONAL JEWISH HEALTH (100.0%)
1400 JACKSON STREET
DENVER, CO 80206, US**

72 Inventor/es:

SCHIEMANN, WILLIAM, P.

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 576 195 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

Cistatina C como antagonista de TGF- β y métodos relacionados con la misma

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere, en líneas generales, a homólogos de Cistatina C (CysC) para inhibir la actividad biológica de la unión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) con su receptor.

10 **Estado de la técnica**

La superfamilia de cistatina de inhibidores de cisteína proteinasa está compuesta por tres familias principales: cistatinas de Tipo 1, que son citosólicas e incluyen estefinas A y B; cistatinas de Tipo 2, que están presentes en la mayoría de fluidos corporales e incluyen las cistatinas C, D, E, F y S; y cistatinas de Tipo 3, que están presentes en plasma e incluyen los quininógenos y fetuina (1, 2). Colectivamente, estas moléculas inactivan las cisteína proteinasas y por tanto regulan (i) la resorción ósea, la quimiotaxis de neutrófilos, y la inflamación tisular, (ii) el procesamiento de hormonas y la presentación de antígeno, y (iii) la resistencia a infecciones bacterianas y víricas (1-3). La Cistatina C (CysC) es una proteína secretora de pequeño peso molecular (~16 kDa) expresada de forma ubicua que inactiva preferentemente la catepsina B, una cisteína proteinasa implicada en la estimulación de la invasión de células cancerosas y la metástasis (4, 5), y en la inactivación de TGF- β latente de depósitos ECM inactivos (6, 7). A través de su motivo inhibidor de cisteína proteasa conservado, CysC se une a e inactiva la catepsina B formando un complejo enzima-inhibidor de alta afinidad, reversible (8, 9). Independiente de sus efectos sobre la actividad de catepsina B, CysC también regula la proliferación celular (10, 11), creando la posibilidad de que CysC aborde rutas dependientes e independientes de proteinasa.

Mutaciones en o expresión alterada de CysC se ha ligado al desarrollo y progresión de varias patologías humanas. Por ejemplo, una única mutación puntual en CysC causa angiopatía amiloide por CysC hereditaria, una enfermedad dominante autosómica mortal que provoca hemorragias cerebrales masivas en adultez temprana (12). Además, se usa la expresión alterada de CysC o niveles en suero inhibidores de enzima como marcadores de diagnóstico para insuficiencia renales crónicas (13), y para cánceres de pulmón, piel, colon, y el compartimiento mieloide (3, 14-16). Por tanto, concentraciones alteradas de CysC dentro de microentornos celulares tienen consecuencias directas que conducen al desarrollo y progresión de enfermedades humanas.

La clonación y producción recombinante de Cistatina C se describió en el documento DE3724581 e "In vitro anti-cancer activities in Caco-S and HCT-116 cells of recombinant cystatin C prepared by a *Pichia* expression system" se analiza en Ogawa Masahiro *et al.*, (Biosis [online] Biosciences information service, Filadelfia, enero de 2003).

TGF- β es una citoquina multifuncional que gobierna el crecimiento celular y la motilidad en parte a través de su regulación de los microentornos celulares, y por tanto desempeña un papel prominente en la regulación del desarrollo de enfermedades en seres humanos (17). Es crítico para la regulación de los microentornos celulares por TGF- β su inducción o represión de citoquinas, factores de crecimiento, y proteína ECM por fibroblastos (17).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) también es un potente supresor de la proliferación de células epiteliales mamarias (MEC) y, por tanto, un inhibidor de la formación de tumores mamarios. Sin embargo, eventos genéticos y epigenéticos aberrantes que operan durante la tumorigénesis típicamente anulan la función citostática de TGF- β , contribuyendo de ese modo a la formación y progresión de tumores. Por ejemplo, las MEC malignas típicamente desarrollan resistencia de la detención del crecimiento mediada por TGF- β , potenciando por tanto su proliferación, invasión, y metástasis cuando se estimulan por TGF- β . Recientes hallazgos sugieren que agentes terapéuticos diseñados para antagonizar la señalización de TGF- β pueden aliviar la progresión de cáncer de mama, mejorando de ese modo el pronóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

Transiciones epiteliales-mesenquimáticas (EMT) oncogénicas comprenden una serie compleja de expresión y represión génica que provoca metástasis tumoral en carcinomas localizados (Thiery, 2002; Grunert *et al.*, 2003). La adquisición de fenotipos metastásicos por tumores desdiferenciados es la faceta más letal del cáncer y la causa principal de muerte relacionada con cáncer (Yoshida *et al.*, 2000; Fidler, 2002). El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) normalmente reprime estos procesos impidiendo la proliferación de células epiteliales, y creando un microentorno celular que inhibe la motilidad, invasión, y metástasis de células epiteliales (Blobe *et al.*, 2000; Siegel, 2003). La carcinogénesis a menudo altera la función supresora de tumores de TGF- β , dotando de ese modo a TGF- β con actividades oncogénicas que promueven el crecimiento y propagación de tumores en desarrollo, incluyendo el inicio y estabilización de EMT tumoral (Thiery, 2002; Grunert *et al.*, 2003; Blobbe *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2003; Wakefield *et al.*, 2002).

La dualidad de TGF- β para tanto suprimir como promover el desarrollo del cáncer se observó originalmente usando expresión de TGF- β 1 transgénico en queratinocitos de ratón, que inicialmente suprimían la formación de tumor cutáneo benigno antes de promover la conversión maligna y la generación de carcinoma de células fusiformes (Cui *et al.*, 1996). Más recientemente, se demostró que la señalización de TGF- β inhibía la tumorigenicidad de células

epiteliales de mama normales, premalignas, y malignas, estimulando al mismo tiempo la de células cancerosas de mama altamente invasivas y metastásicas (Tang *et al.*, 2003). Existen vacíos fundamentales en el conocimiento del modo en que las células malignas superan las acciones citostáticas de TGF- β , y del modo en que TGF- β estimula la progresión de tumores en desarrollo. De hecho, estos vacíos en el conocimiento han evitado que la ciencia y la medicina desarrollen tratamientos eficaces para antagonizar la oncogenicidad de TGF- β en cánceres en progresión, particularmente aquellos de mama.

TGF- β se expresa ampliamente durante el desarrollo para regular las interacciones entre las células epiteliales y mesenquimáticas, particularmente aquellas en el pulmón, riñón, y glándula mamaria. La reactivación inapropiada de EMT durante la tumorigénesis ahora está reconocida como un proceso importante necesario para la adquisición tumoral de fenotipos invasivos y metastásicos (Thiery, 2002; Grunert *et al.*, 2003). Por cooperación con oncogenes y factores de crecimiento, TGF- β induce potencialmente EMT y sirve para estabilizar esta transición mediante señalización autocrina. Además, estos eventos parecen subyacer a la oncogenicidad de TGF- β y su capacidad de promover la progresión del cáncer (Miettinen *et al.*, 1994; Oft *et al.*, 1998; Oft *et al.*, 1996; Portella *et al.*, 1998). La disección molecular de los sistemas de señalización de TGF- β necesarios para su inducción de EMT ha establecido claramente un papel para Smad2/3 en la mediación de EMT, particularmente cuando se acopla con señales procedentes de Ras oncogénica (Piek *et al.*, 1999; Oft *et al.*, 2002; Janda *et al.*, 2002). Sin embargo, la señalización independiente de Smad2/3 también se ha implicado en la estimulación por TGF- β de EMT. Por ejemplo, TGF- β estimula EMT en cánceres de mama y otros tejidos activando PI-3-quinasa, AKT, RhoA, p160 (ROCK), y p38 MAPK (Janda *et al.*, 2002; Bhowmick *et al.*, 2001, Mol. Biol. Cell; Bhowmick *et al.*, 2001, J. Biol. Chem.; Bakin *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002). Además, EMT en MEC tratadas con TGF- β se anula por medidas que inhiben la actividad de integrina β 1 (Bhowmick *et al.*, 2001, J. Biol. Chem.), estableciendo por tanto la necesidad de la expresión de integrina β 1 para EMT estimulado por TGF- β . Finalmente, reprimiendo la expresión de Id2 e Id3 (Kowanetz *et al.*, 2004), induciendo la expresión de Snail y SIP1 (Kang *et al.*, 2004), y estimulando la actividad NF- κ B (Huber *et al.*, 2004), TGF- β regula la actividad del factor de transcripción que funciona en la mediación de la transición de marcadores celulares epiteliales a mesenquimáticos. Claramente, EMT y los mecanismos por los cuales TGF- β participa en este proceso implican una cascada compleja de expresión y represión génica, cuya magnitud sigue teniendo que dilucidarse completamente.

Por consiguiente, aunque TGF- β inhibe claramente el crecimiento y desarrollo de tumores en fase prematura, una cantidad creciente de evidencias implica la señalización de TGF- β como estímulo necesario para la metástasis y diseminación de tumores en fase tardía (Blobe *et al.*, 2000; Siegel, 2003). Una comprensión completa del modo en que TGF- β tanto suprime como promueve la tumorigénesis sigue siendo una cuestión desconocida y fundamental que impacta directamente sobre nuestra capacidad de abordar de forma eficaz el sistema de señalización de TGF- β durante el tratamiento de neoplasias humanas. De hecho, descifrar esta paradoja sigue siendo la cuestión más importante referente a las acciones biológicas y patológicas de esta citoquina multifuncional. La capacidad de TGF- β de inducir el crecimiento y metástasis del cáncer sugiere que el desarrollo de agentes terapéuticos para antagonizar y/o evitar la señalización de TGF- β podría demostrar ser eficaz en el tratamiento de neoplasias metastásicas, quizá evitando la estimulación por TGF- β de EMT.

Descripción de las figuras

La Fig. 1A es un gráfico de barras que muestra que la expresión de CystC inhibía significativamente la invasión de células HT1080 a través de matrices Matrigel.

La Fig. 1B es un gráfico de líneas que muestra que la expresión de Δ 14CystC, que carece del motivo inhibidor de cisteína y por tanto es incapaz de inactivar la cathepsina B, no lograba afectar a la invasión de células HT1080.

La Fig. 2A es un gráfico de barras que muestra que las células 3T3-L1 que invadían fácilmente a través de matrices Matrigel cuando se estimulaban por suero no se veían afectadas por Δ 14CystC, pero se inhibían significativamente por CystC.

La Fig. 2B es un gráfico de barras que muestra que la administración de CystC recombinante bloqueaba la invasión de células 3T3-L1 estimuladas por suero y suero: TGF- β , mientras que Δ 14CystC recombinante la bloqueaba selectivamente por TGF- β .

La Fig. 3A es un gráfico de líneas que muestra que la expresión de CystC o Δ 14CystC reducía significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β en comparación con células de control.

La Fig. 3B es un gráfico de barras que muestra que CystC recombinante y Δ 14CystC inhibían significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β en células 3T3-L1.

La Fig. 4A es un gráfico de líneas que muestra que CystC antagoniza la unión de TGF- β 1 a receptores de TGF- β .

La Fig. 4B es un gráfico que muestra que CystC inhibe la unión de TGF- β a T β R-II.

La Fig. 5A es un gráfico de barras que muestra que el tratamiento con CystC recombinante o Δ 14CystC o su sobreexpresión en células NMuMG evitaba la reorganización del citoesqueleto de actina estimulada por TGF- β , y también antagonizaba la regulación negativa mediada por TGF- β de E-cadherina.

La Fig. 5B es un gráfico de barras que muestra que la expresión de CystC y Δ 14CystC inhibía y delimitaba la invasión dependiente de cathepsina y TGF- β en células NMuMG.

La Fig. 6A es un gráfico de barras que muestra que la expresión mediada por retrovirus de CystC o Δ 14CystC en células NRK evitaba completamente la transformación morfológica estimulada por TGF- β .

La Fig. 6B es un gráfico de barras que muestra que la expresión mediada por retrovirus de CystC o $\Delta 14$ CystC en células NRK evitaba completamente la estimulación de TGF- β en la invasión de células NRK a través de membranas basales sintéticas.

5 Objeto de la invención

Una realización de la presente invención se refiere a un homólogo de Cistatina C aislado para inhibir a actividad biológica de la unión de TGF- β con su receptor. La Cistatina C de tipo silvestre tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

La secuencia de aminoácidos del homólogo difiere de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cistatina C de tipo silvestre, por una delección, inserción, sustitución o derivatización de al menos un resto de aminoácido. En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos del homólogo difiere de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cistatina C de tipo silvestre en una alteración de la secuencia de tipo silvestre suficiente para reducir o eliminar la actividad biológica del motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado. Por ejemplo, la proteína Cistatina C de tipo silvestre puede representarse por la SEQ ID NO: 2 y el motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado puede estar localizado entre aproximadamente la posición 80 y aproximadamente la posición 93 de la SEQ ID NO: 2.

Por tanto, se proporciona un homólogo de Cistatina C, para inhibir la actividad biológica de la unión de TGF- β con su receptor, donde el homólogo de Cistatina C comprende un fragmento de secuencia de aminoácidos que comprende al menos los últimos 45 aminoácidos C-terminales de la SEQ ID NO: 2 y donde al menos 30 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2 están deletados, o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 2 por delección de los restos de aminoácido de aproximadamente la posición 80 hasta aproximadamente la posición 93 donde la delección es suficiente para reducir o eliminar la actividad biológica del motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado de Cistatina C.

Otra realización de la presente invención se refiere a una proteína aislada que comprende un fragmento de una proteína Cistatina C de tipo silvestre que inhibe la actividad biológica de TGF- β . En un aspecto, la proteína inhibe la unión de TGF- β con su receptor, incluyendo, aunque sin limitación, T β R-II.

En un aspecto, el fragmento comprende al menos aproximadamente 100 aminoácidos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos, o al menos aproximadamente 55 aminoácidos, de la parte C-terminal de la proteína Cistatina C de tipo silvestre. En otro aspecto, el fragmento difiere de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre por una delección de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, o al menos aproximadamente 60 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína de tipo silvestre.

La descripción también se refiere a una composición, incluyendo una composición terapéutica que comprende cualquiera de los homólogos o fragmentos identificados anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe un método para inhibir la neoplasia o invasión tumoral que comprende administrar a una célula tumoral un homólogo de Cistatina C que tiene actividad biológica. En un aspecto, la actividad biológica comprende la inhibición de la unión de TGF- β con su receptor. La descripción también se refiere a un método para inhibir la actividad biológica de TGF- β , que comprende administrar a una célula, a un tejido o a un paciente, un homólogo de Cistatina C en una cantidad eficaz para inhibir la actividad biológica de TGF- β . En un aspecto, el método se usa para tratar a un paciente con cáncer. En otro aspecto, el método se usa para tratar a un paciente que tiene, o que está predispuesto a desarrollar, cáncer metastásico. En otro aspecto más, el método se usa para tratar a un paciente que tiene una afección o enfermedad proliferativa o fibrótica mediada al menos en parte por la expresión o actividad de TGF- β .

La descripción también describe un método para diseñar un antagonista o inhibidor de la actividad de TGF- β , que comprende: (a) diseñar o identificar un compuesto antagonista putativo basado en la estructura de Cistatina C; (b) sintetizar el compuesto; y (c) seleccionar compuestos de (b) que inhiban la actividad biológica de TGF- β . En un aspecto, la etapa (a) comprende realizar el diseño de fármacos basado en estructura con un modelo que represente la estructura de Cistatina C. En otro aspecto, la etapa de selección comprende seleccionar compuestos que inhiban la unión de TGF- β con su receptor. En un aspecto, la etapa de selección, comprende seleccionar compuestos que inhiban la neoplasia o invasión de células tumorales mediada por TGF- β .

También se describe en este documento un método para identificar proteínas que sean inhibidores de TGF- β , que comprende: (a) identificar proteínas que son homólogos estructurales de Cistatina C; y (b) evaluar proteínas de (a) que sean capaces de regular la actividad biológica de TGF- β . En un aspecto, la etapa (a) comprende identificar homólogos estructurales o fragmentos de Cistatina C usando análisis de secuencia. En otro aspecto, el método de evaluación comprende detectar si la proteína de (a) inhibe la unión de TGF- β con su receptor. En un aspecto, la etapa de selección comprende seleccionar compuestos que inhiban la neoplasia o invasión de células tumorales mediada por TGF- β .

Se describe un método para identificar un regulador del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que comprende: (a) poner en contacto una célula que expresa un receptor de TGF- β y Cistatina C con un compuesto regulado putativo; (b) detectar la expresión de Cistatina C en la célula; y (c) comparar la expresión de Cistatina C después de su contacto con el compuesto con la expresión de Cistatina C antes del contacto con el compuesto, donde la detección de un cambio en la expresión de Cistatina C, en la célula después del contacto con el compuesto en comparación con antes del contacto con el compuesto indica que el compuesto es un regulador putativo de TGF- β y la transducción de señales de TGF- β .

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en líneas generales al uso de homólogos de Cistatina C, y fragmentos biológicamente activos de los mismos, para inhibir la actividad biológica de la unión de TGF- β con su receptor y rutas de transducción de señales de TGF- β . La presente descripción se refiere a diversas composiciones que comprenden homólogos de Cistatina C y fragmentos biológicamente activos de los mismos para su uso en métodos terapéuticos, de diagnóstico y de selección de fármacos. La presente invención se refiere al uso de homólogos de Cistatina C y fragmentos biológicamente activos de los mismos, para tratar o prevenir neoplasias tumorales, incluyendo invasión tumoral, incluyendo neoplasia tumoral que está mediada por catepsina B o por TGF- β . La presente descripción también se refiere a métodos de regulación de la expresión y/o actividad de Cistatina C (es decir, regulación positiva o negativa) para regular (como antagonista o agonista) la actividad biológica de TGF- β o las rutas de transducción de señales de TGF- β (es decir, la transducción de señales del receptor de TGF- β y la expresión, activación y/o actividad biológica de genes corriente abajo regulados por TGF- β , así como la regulación de los receptores de TGF- β). En particular, dichos métodos pueden usarse para tratar o mejorar al menos un síntoma de una enfermedad o afección en que TGF- β desempeña un papel, incluyendo cánceres y diversas afecciones y enfermedades proliferativas y fibróticas asociadas con la actividad de TGF- β . La presente invención también se refiere al uso de homólogos de Cistatina C y fragmentos biológicamente activos de los mismos como compuestos principales para el desarrollo de antagonistas adicionales (o agonistas) de la actividad biológica de TGF- β . La presente invención puede incluir la regulación de cualquiera de las isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y/o TGF- β 3) por homólogos de Cistatina C y fragmentos biológicamente activos de los mismos. En una realización, se inhibe la actividad biológica de TGF- β 1 o TGF- β 3. En otra realización, se inhibe la actividad biológica de TGF- β 2. En otra realización más, se regula la actividad biológica de uno cualquiera de TGF- β 1, TGF- β 2 y/o TGF- β 3.

En este documento, el inventor muestra que TGF- β estimula el transcrito y la expresión proteica de CystC en fibroblastos 3T3-L1 murinos. El inventor muestra adicionalmente que CystC está regulada negativamente de forma aberrante en tumores humanos, y que su sobreexpresión en células de fibrosarcoma HT1080 humanas altamente malignas inhibe su invasión de un modo dependiente de catepsina B. De forma interesante, CystC también inhibe la expresión de células HT1080 de genes sensibles a TGF- β mediante un mecanismo independiente de catepsina B. La invasión de células 3T3-L1 continúa a través de las rutas dependientes de catepsina B y TGF- β : CystC inhibe ambas rutas, mientras que un mutante de CystC (es decir, Δ 14CystC) incapaz de inactivar catepsina B inhibe selectivamente la invasión dependiente de TGF- β , lo que sugiere que CystC aborda rutas de señalización, dependientes e independientes de proteínasa. Por consiguiente, tanto CystC como Δ 14CystC reducen significativamente la expresión génica estimulada por TGF- β en células 3T3-L1 mediante la inhibición de la unión de TGF- β 1 con su receptor de tipo II (T β R-II). Colectivamente, los hallazgos descritos en este documento establecen un novedoso bucle de retroalimentación mediado por CystC que inhibe la señalización de TGF- β , haciéndolo por antagonización de la unión de TGF- β a T β R-II.

Más específicamente, los microentornos celulares desempeñan un papel importante en la regulación de la fisiología y homeostasis de las células, incluyendo su supervivencia, proliferación, diferenciación, y motilidad (35). TGF- β es un potente supresor tumoral que evita el desarrollo del cáncer inhibiendo la progresión del ciclo celular, y creando microentornos celulares que inhiben el crecimiento celular incontrolado, la invasión, y la metástasis. Durante la progresión del cáncer, la función supresora tumoral de TGF- β está frecuentemente alterada, transformando por tanto TGF- β de un supresor de la formación de cáncer a un promotor de su crecimiento y metástasis (17, 24). Aunque suceden mutaciones en el sistema de señalización de TGF- β durante la carcinogénesis y contribuyen a la formación de tumores anulando la detención del ciclo celular mediada por TGF- β (17, 24), estas aberraciones no explican la función paradójica de TGF- β para promover la proliferación, invasión, y metástasis de células cancerosas previamente liberadas de sus acciones inhibitorias del crecimiento. Como alternativa, estudios recientes han establecido los fibroblastos como intermediarios instrumentales del crecimiento y metástasis tumoral estimulados por TGF- β . Cuando se activan por TGF- β , los fibroblastos sintetizan y secretan una diversidad de citoquina, factores de crecimiento, y proteínas ECM en microentornos de tumor: hospedador. Estas proteínas secretoras facilitan la interacción tumor:hospedador que finalmente promueve la inducción, selección, y expansión de células neoplásicas potenciando su crecimiento, supervivencia, y motilidad (36). El inventor, por lo tanto, busca identificar estas proteínas secretoras de fibroblastos reguladas por TGF- β , y determinar su función en células normales y cancerosas.

El inventor ahora presenta CystC como una diana génica para TGF- β en fibroblastos 3T3-L1. El inventor muestra que la expresión de CystC está regulada negativamente de forma prominente en cánceres humanos (véase el Ejemplo 2), y a la inversa, que el aumento de la expresión de CystC en células de fibroblasto altamente malignas

reducía significativamente su invasión a través de membranas basales sintéticas (Fig. 1). Lo más sorprendente, estos estudios identificaron CystC como un antagonista novedoso de la señalización de TGF- β (Fig. 1-3). De hecho, el inventor muestra por primera vez que CystC inhibe la expresión génica (Fig. 1 y 3) y la invasión celular (Fig. 3) estimulada por TGF- β , haciéndolo por antagonización de la unión de TGF- β a T β R-II (Fig. 4). Por tanto, el estudio del inventor define una novedosa función independiente de catepsina B para CystC, y ha identificado potencialmente un novedoso bucle de retroalimentación mediado por CystC diseñado para inhibir la señalización de TGF- β .

La inactivación de la actividad proteínasa de catepsina B por CystC ha sido un punto central de numerosas investigaciones dirigidas a comprender las propiedades invasivas de las células cancerosas (19, 37, 38). Aunque está generalmente aceptado que la catepsina B extracelular media la invasión de células cancerosas, un reciente informe de Szpaderska y Frankfater (20) ha proporcionado evidencias de lo contrario demostrando la importancia de la catepsina B intracelular para la invasión de células cancerosas a través de matrices Matrigel. En contraste, el inventor muestra en este documento que la expresión de CystC, y no Δ 14CystC, inhibía significativamente la invasión de células HT1080. Además, el inhibidor de catepsina B permeable en células, CA-074ME, no lograba alterar la invasión de células HT1080, mientras que su equivalente impermeable en células, el inhibidor II de catepsina B, recapitulaba completamente el efecto inhibitorio de CystC sobre la invasión de células HT1080. Por tanto, la invasión de células HT1080 sucede predominantemente mediante las actividades proteínasa de catepsina B extracelular, que está sometida a inactivación por CystC.

Los estudios del presente inventor también proporcionan la primera evidencia de que la invasión de células 3T3-L1 procede a través de un sistema de señalización bifurcado acoplado a la activación de la señalización de catepsina B y TGF- β . Además, las capacidades diferenciales de CystC (es decir, ambas rutas) y Δ 14CystC (es decir, ruta de TGF- β) para inhibir la invasión de células 3T3-L1 implica a CystC como regulador clave no solamente de la invasión mediada por catepsina B, sino también la mediada por TGF- β . Aunque las rutas proteolíticas dirigidas por TGF- β en células 3T3-L1 siguen siendo desconocidas, sin el deseo de limitarse a teoría alguna, el presente inventor sospecha la implicación de miembros de la familia de metaloproteínasa de matriz (por ejemplo, MMP-2 y MMP-9) cuya expresión y actividad están reguladas por TGF- β (39). Estudios que exploten las propiedades anti-TGF- β de Δ 14CystC facilitarán la identificación y disección de esta ruta invasiva regulada por TGF- β . De hecho, tanto la catepsina B (19) como TGF- β (40) se localizan en la cara invasora de tumores altamente malignos. Además de su papel en la invasión de células cancerosas, la catepsina B también media la activación de TGF- β latente (6, 7), y por tanto, se predeciría que potencia los efectos promotores de tumor de TGF- β . En base a estos hallazgos, el inventor propone que medidas diseñadas para suministrar CystC a tumores en desarrollo reducirían su malignidad inhibiendo (i) la invasión mediada por catepsina B, (ii) la activación de TGF- β mediada por catepsina B, y (iii) la transducción de señales de TGF- β .

El presente inventor (Ejemplo 2) y otros (3, 37) han descubierto que la tumorigénesis induce regulación negativa significativa de la expresión de CystC, coherente con una función supresora tumoral para CystC. Recientemente, se generaron ratones deficientes en la expresión de CystC y se descubrió que eran viables y no mostraban anomalías pronunciadas (41). Además, no se detectaron diferencias en la latencia y crecimiento de tumores subcutáneos e intracerebrales en ratones de tipo silvestre y CystC nulos. De forma bastante sorprendente, la colonización del pulmón por células cancerosas se suprimió en ratones deficientes en CystC en comparación con sus equivalentes de tipo silvestre (41). Aunque el mecanismo que media este efecto contradictorio de CystC sobre la metástasis de células cancerosas actualmente es desconocido, los autores especulan que una actividad de catepsina B mal regulada suprime la metástasis catabolizando citoquinas/factores de crecimiento locales necesarios para que la célula cancerosa metastásica se asiente y crezca (41). En base a los presentes hallazgos, el inventor en su lugar propone que la deficiencia en CystC aumenta la señalización de TGF- β tónica, provocando supresión tumoral potenciada y la creación de microentornos celulares que no logran dar soporte de forma eficaz a la propagación metastásica y el asentamiento de células cancerosas. Por lo tanto, sin el deseo de limitarse a teoría alguna, el inventor propone que la deficiencia en CystC puede potenciar la respuesta celular a TGF- β (es decir, mediante pérdida del bucle de retroalimentación mediado por CystC).

Finalmente, el miembro de la familia de cistatina de Tipo 3, fetuína, también se ha caracterizado como un antagonista de TGF- β (27-29). La fetuína contiene un dominio TRH1 de 19 aminoácidos (homólogo 1 del receptor II de TGF- β ; (29)) que interacciona físicamente con TGF- β y evita su unión a receptores de TGF- β (29). Aunque CystC contiene una secuencia C-terminal de 21 aminoácidos que tiene similitud a TRH1, el presente inventor fue incapaz de observar una interacción física directa entre TGF- β y CystC. En contraste, el inventor descubrió que CystC inhibe la unión de TGF- β a T β R-II, tanto en células vivas como *in vitro*. De forma interesante, estudios de estructura-función iniciales del inventor han implicado el dominio C-terminal de CystC en la mediación de su antagonismo de la señalización de TGF- β . Dada la identificación de dos miembros de la superfamilia de CystC capaces de inhibir la señalización de TGF- β , el inventor propone que miembros adicionales de la superfamilia de CystC pueden funcionar de forma similar para antagonizar las actividades de otros miembros de la superfamilia de TGF- β , así como las actividades de otras citoquinas/factores de crecimiento. De forma importante, los hallazgos del presente inventor dan credibilidad para futuros estudios dirigidos a explotar las propiedades anti-TGF- β de CystC (o Δ 14CystC) de inhibir selectivamente las actividades oncogénicas de TGF- β . De hecho, CystC formará la base para el diseño racional de fármacos para facilitar el desarrollo de antagonistas específicos del receptor de TGF- β necesarios para mejorar la respuesta terapéutica de neoplasias humanas, así como una diversidad de enfermedades proliferativas y fibróticas.

reguladas por TGF- β .

Dados estos resultados, el inventor ensayó adicionalmente la capacidad de CystC, como antagonistas de T β R-II, de bloquear las actividades oncogénicas de TGF- β , particularmente su capacidad de estimular la transición epitelial-mesenquimática (EMT). Más específicamente, el presente inventor ensayó las propiedades inhibitoras de oncogénesis de CystC midiendo la capacidad de CystC de antagonizar la oncogenicidad de TGF- β en dos modelos *in vitro* establecidos de progresión de cáncer: (i) EMT de células epiteliales mamarias (MEC) NMuMG murinas normales, y (ii) transformación morfológica y crecimiento independiente de anclaje de fibroblastos renales de rata (NRK) normales. El presente inventor demuestra en este documento que CystC anulaba de forma eficaz y completa la estimulación por TGF- β de EMT y la transformación morfológica en células epiteliales mamarias y de riñón, respectivamente. Por tanto, antagonizando la señalización de TGF- β y evitando su estimulación de EMT, se cree que CystC representa un novedoso agente quimiopreventivo de TGF- β eficaz en la neutralización de la oncogenicidad de TGF- β y su estimulación de metástasis tumoral.

Más específicamente, como se describe en los Ejemplos en detalle (véanse los Ejemplos 8 y 9), CystC y Δ 14CystC (un mutante de CystC alterado en su capacidad de inhibir la actividad proteasa de cathepsina) ambos inhibían la EMT de células NMuMG y la invasión estimulada por TGF- β evitando reordenamientos del citoesqueleto de actina y la regulación negativa de E-cadherina. Además, ambas moléculas de CystC antagonizaban completamente la transformación morfológica mediada por TGF- β y el crecimiento independiente de anclaje de células NRK, y también inhibían su invasión a través de membranas basales sintéticas. Por lo tanto, el presente inventor ha demostrado que la estimulación por TGF- β de eventos metastásicos iniciadores, incluyendo la polarización celular disminuida, el contacto célula-célula reducido, y la elevada invasión y migración celular, se evitaban completamente por tratamiento con CystC.

Por consiguiente, el inventor ha demostrado que CystC y β 14CystC evitaban ambos la EMT y la transformación morfológica estimulada por TGF- β , y por tanto propone estas pequeñas moléculas como modelos innovadores para el desarrollo de novedosos antagonistas de T β R-II diseñados para combatir la estimulación por TGF- β de la progresión tumoral y EMT. El inventor propone adicionalmente que la eficacia quimiopreventiva de CystC se potenciará por su inhibición de la invasión y metástasis mediada por cathepsina B (Turk *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003; Turk *et al.*, 2000; Roshy *et al.*, 2003), y de la activación mediada por cathepsina B de TGF- β latente (Somana *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002; Gantt *et al.*, 2003), que se colocaliza con cathepsina B en la cara invasora de tumores malignos (Wakefield, 2001; Calkins *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 1995; Sameni *et al.*, 2000). Además, la inactivación de cathepsina B mediada por CystC reducía la actividad del sistema de plasminógeno de uroquinasa, que potencia la degradación de la matriz extracelular de células tumorales, así como la activación del factor de crecimiento y TGF- β latente (Choong *et al.*, 2003). De forma acumulativa, las actividades quimiopreventivas de CystC antagonizarán la respuesta de células cancerosas a TGF- β inhibiendo la unión de TGF- β , así como reduciendo la biodisponibilidad de TGF- β en microentornos tumorales, aliviando de ese modo la estimulación por TGF- β de EMT y metástasis tumoral en tumores en fase tardía.

En resumen, el inventor demostró la eficacia de CystC en la inhibición de EMT de MEC y la transformación morfológica de fibroblastos estimulada por TGF- β . El antagonismo por CystC de la señalización de TGF- β en MEC sucede independiente de su activación de actividad proteasa de cathepsina, supuestamente mediante la formación del complejo CystC:T β R-II y la prevención de la unión de TGF- β . El inventor propone que CystC o sus peptidomiméticos finalmente posee el potencial de mejorar la respuesta terapéutica de neoplasias humanas reguladas por TGF- β , particularmente cánceres de mama.

También se describe en este documento el uso de inhibidores de CystC para regular los efectos biológicos de CystC sobre TGF- β . Se entenderá que esta invención no está limitada a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies animales o géneros, construcciones, o reactivos descritos en este documento, ya que estos pueden variar. También tiene que entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la invención que estará únicamente limitada por las reivindicaciones adjuntas. Todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención salvo que se indique claramente de otro modo. Además, en la medida en que cualquier análisis siguiente sea general o genético, puede aplicarse a cualquiera de las proteínas, ácidos nucleicos, homólogos, fragmentos y miméticos descritos en este documento, así como a cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Una realización de la presente invención se refiere a homólogos de Cistatina C y fragmentos de la misma que son útiles en métodos que aprovechan la capacidad de Cistatina C de regular la actividad de TGF- β interfiriendo con la capacidad de TGF- β de interactuar con su receptor. En particular, la presente invención se refiere a homólogos de Cistatina C, incluyendo homólogos tanto proteicos como sintéticos (también llamados miméticos) que tienen la actividad biológica de la proteína Cistatina C de tipo silvestre, o que al menos tienen la capacidad de regular la actividad de TGF- β interfiriendo con la capacidad de TGF- β de interactuar con su receptor. También están abarcadas por la invención composiciones y formulaciones que comprenden dichas proteínas y homólogos, así como métodos de uso de dichas proteínas y homólogos.

Como se ha analizado anteriormente, Cistatina C (CystC) es una proteína secretora de pequeño peso molecular (~16 kDa), expresada de forma ubicua que inactiva preferentemente cathepsina B, una cisteína proteinasa implicada en la estimulación de la invasión y metástasis de células cancerosas, y en la activación de TGF- β latente desde depósitos de ECM inactivos. A través de su motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado, CystC se une e inactiva cathepsina B formando un complejo enzima-inhibidor de alta afinidad, reversible. Además, como se demuestra en este documento, CystC inhibe la expresión génica y la invasión celular estimulada por TGF- β , haciéndolo por antagonismo de la unión de TGF- β a T β R-II. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para Cistatina C a partir de una diversidad de especies animales, son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica Cistatina C humana se encuentra en la base de datos del NCBI GI n.º 19882253 y está representada en este documento por la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 codifica la secuencia de aminoácidos de Cistatina C humana representada en este documento por la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la Cistatina C murina se encuentra en la base de datos del NCBI GI n.º 31981821 y está representada en este documento por la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 codifica la secuencia de aminoácidos de Cistatina C murina representada en este documento por la SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica Cistatina C de rata se encuentra en la base de datos del NCBI GI n.º 34858909 y está representada en este documento por la SEQ ID NO: 5. La SEQ ID NO: 5 codifica la secuencia de aminoácidos de Cistatina C de rata representada en este documento por la SEQ ID NO: 6. La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica Cistatina C bovina se encuentra en la base de datos del NCBI GI n.º 27806674 y está representada en este documento por la SEQ ID NO: 7. La SEQ ID NO: 7 codifica la secuencia de aminoácidos de Cistatina C bovina representada en este documento por la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica Cistatina C de mono Rhesus se encuentra en la base de datos del NCBI GI n.º 2281118 y está representada en este documento por la SEQ ID NO: 9. La SEQ ID NO: 9 codifica la secuencia de aminoácidos de Cistatina C de mono Rhesus representada en este documento por la SEQ ID NO: 10. Existe un alto grado de homología entre las proteínas Cistatina C de estas diversas especies de animales. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos murina, de rata, bovina y de mono Rhesus son aproximadamente un 67 %, 68 %, 68 %, y 97 % idénticas, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos de Cistatina C humana sobre la longitud completa de dichas secuencias. La Cistatina C humana se ha cristalizado y se ha determinado la estructura, y las coordenadas atómicas para la estructura terciaria de Cistatina C se encuentran en el n.º de acceso de la base de datos de proteínas 1G96 (descrita en y depositada por Janowski *et al.*, Nat. Struct. Biol. 8(4):316-320, 2001).

Una proteína aislada, de acuerdo con la presente invención, es una proteína que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de forma recombinante, y proteínas producidas de forma sintética, por ejemplo. Por tanto, "aislada" no refleja el grado al cual se ha purificado la proteína. Preferiblemente, una proteína aislada de la presente invención se produce de forma recombinante. Referencias a una proteína particular de un organismo específico, tal como una "proteína Cistatina C humana", a modo de ejemplo, se refiere a una proteína Cistatina C "incluyendo un homólogo de una proteína Cistatina C de origen natural" de un ser humano o una proteína Cistatina C que se ha producido de otro modo a partir del conocimiento de la estructura (por ejemplo, secuencia) de una proteína Cistatina C de origen natural de un ser humano. En otras palabras, una proteína Cistatina C humana incluye cualquier proteína Cistatina C que tenga la estructura y función de una proteína Cistatina C de origen natural de un ser humano o que tiene una estructura y función que son suficientemente similares a una proteína Cistatina C humana de modo que la proteína Cistatina C sea un homólogo biológicamente activo (es decir, tenga actividad biológica) de una proteína Cistatina C de origen natural de un ser humano. Por tanto, una proteína Cistatina C humana puede incluir proteínas purificadas, parcialmente purificadas, recombinantes, mutadas/modificadas y sintéticas.

En general, la actividad biológica o acción biológica de una proteína se refiere a cualquier función mostrada o realizada por la proteína que está atribuida a la forma de origen natural de la proteína medida u observada *in vivo* (es decir, en el entorno fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio). Modificaciones de una proteína, tal como en un homólogo o mimético (analizado a continuación), pueden producir proteínas que tengan la misma actividad biológica que la proteína de origen natural, o proteínas que tengan actividad biológica disminuida o aumentada en comparación con la proteína de origen natural. Modificaciones que provoquen una disminución en la expresión de proteínas o una disminución en la actividad de la proteína, puede mencionarse como inactivación (completa o parcial), regulación negativa, o acción disminuida de una proteína. Asimismo, modificaciones que provoquen un aumento en la expresión de proteínas o un aumento en la actividad de la proteína puede mencionarse como amplificación, sobreproducción, activación, potenciación, regulación positiva o acción aumentada de una proteína.

De acuerdo con la presente descripción, la actividad biológica de Cistatina C puede incluir una o más (o todas) de las siguientes actividades biológicas de Cistatina C de tipo silvestre: inhibición de una cisteína proteasa, y particularmente cathepsina B (por ejemplo, mediante la unión a e inactivación de cathepsina B por formación de un complejo enzima-inhibidor de alta afinidad, reversible); regulación de la proliferación celular; unión a un receptor de TGF- β (por ejemplo, unión a T β R-II y de ese modo prevención de la activación por TGF- β de T β R-II); e inhibición de la estimulación por TGF- β del inicio de eventos metastásicos, incluyendo polarización celular disminuida, contacto célula-célula reducida, e invasión y migración celular elevadas. De acuerdo con la presente invención, la actividad biológica de CystC puede incluir la regulación de la actividad de cualquier isoforma de TGF- β , incluyendo TGF- β 1,

TGF- β 2 y TGF- β 3. Asimismo, la actividad biológica de CystC puede incluir el antagonismo de la unión de TGF- β a cualquier receptor de una proteína TGF- β , incluyendo, aunque sin limitación, T β R-I, T β R-II, y T β R-III. El presente inventor cree, sin limitarse a teoría alguna, que CystC puede antagonizar la unión de TGF- β por unión más específica a T β R-II, y particularmente al dominio de unión de ligando extracelular de T β R-II, pero el efecto puede incluir inhibición de cualquiera de los tres receptores mencionados anteriormente.

Los métodos de detección y medición de la expresión de proteínas y actividad biológica incluyen, aunque sin limitación, medición de la transcripción de una proteína, medición de la traducción de una proteína, medición de la modificación postraducciona de una proteína, medición de la capacidad de la proteína de unirse a otra u otras proteínas; medición de la capacidad de la proteína de inducir o participar en un efecto biológico particular (por ejemplo, para Cistatina C, inhibición de la actividad cathepsina B, inhibición de la unión de TGF- β a T β R-II, regulación de la proliferación celular, inhibición de TGF- β y malignidad e invasión de células tumorales dependiente de cathepsina B). Se observa que no se requiere que una proteína aislada de la presente invención (incluyendo un homólogo) tenga necesariamente la actividad biológica de la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, una proteína puede ser una proteína truncada, mutada o inactiva, por ejemplo. Dichas proteínas son útiles en ensayos de exploración o ensayos de diagnóstico, por ejemplo, o para otros propósitos tales como producción de anticuerpos. En una realización preferida, las proteínas aisladas de la presente invención tienen una actividad biológica que es similar a la de la proteína de tipo silvestre (aunque no necesariamente equivalente, como se analiza a continuación).

Los métodos para medir los niveles de expresión de proteínas generalmente incluyen, aunque sin limitación: transferencia de Western, inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI-TOF), microcitometría, microserie, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y citometría de flujo, así como ensayos basados en una propiedad de la proteína incluyendo, aunque sin limitación, actividad enzimática o interacción con otros compañeros proteicos. Los ensayos de unión también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una máquina BIAcore para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación para el complejo puede determinarse controlando cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo según pasa tampón sobre el chip (O'Shannessy *et al.*, Anal. Biochem. 212:457-468 (1993); Schuster *et al.*, Nature 365:343-347 (1993)). Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA); o la determinación de la unión mediante el control del cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas a través de fluorescencia, absorción de UV, dicroísmo circular, o resonancia magnética nuclear (RMN).

Los métodos adecuados para su uso en la medición de la actividad biológica de homólogos de Cistatina C de la invención incluyen, aunque sin limitación: ensayos de unión (descritos anteriormente y en los Ejemplos) para la unión de CystC a cathepsina C, a otra cisteína proteasa, o a T β R-II; ensayos para medir el efecto de CystC sobre la actividad cisteína proteasa (por ejemplo, ensayos enzimáticos); ensayos para medir el efecto de CystC sobre la expresión génica (por ejemplo, transferencia de Northern, transferencia de Western, estudios de microseries); ensayos para medir el efecto de CystC sobre la actividad de TGF- β (por ejemplo, ensayos de genes indicadores, ensayos de proliferación, ensayos de unión a receptor, ensayos de inmunofluorescencia); ensayos para medir el efecto de CystC sobre la malignidad e invasión de células tumorales (por ejemplo, ensayos de invasión de células tumorales, ensayos en agar blando, ensayos morfológicos, ensayos de inmunofluorescencia). Otros ensayos para la actividad biológica de CystC basados en la descripción proporcionada en este documento serán evidentes para los expertos en la materia. Se describe una diversidad de diferentes ensayos para determinar y medir la actividad de CystC y homólogos de la misma en los Ejemplos.

La presente invención incluye homólogos de la proteína Cistatina C. Como se usa en este documento el término "homólogo" se usa para hacer referencia a una proteína o péptido que difiere de una proteína o péptido de origen natural (es decir, la proteína "prototipo" o "de tipo silvestre") por una o más modificaciones o mutaciones minoritarias en la proteína o péptido de origen natural, pero que mantiene la estructura proteica y de cadenas laterales básica global de la forma de origen natural (es decir, de modo que el homólogo se pueda identificar como relacionado con la proteína de tipo silvestre). Dichos cambios incluyen, aunque sin limitación: cambios en una o unas pocas cadenas laterales de aminoácido; cambios en uno o unos pocos aminoácidos, incluyendo delecciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o péptido), inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o unos pocos átomos; y/o derivatizaciones minoritarias, incluyendo, aunque sin limitación: metilación, farnesilación, geranilación, glucosilación, carboximetilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, y/o amidación. Un homólogo puede tener propiedades potenciadas, disminuidas o sustancialmente similares en comparación con la proteína o péptido de origen natural. Homólogos preferidos de una proteína Cistatina C se describen en detalle a continuación. Se aprecia que los homólogos pueden incluir homólogos producidos sintéticamente (péptidos o proteínas sintéticas), variantes alélicas de origen natural de una proteína dada, o secuencias homólogas de organismos diferentes al organismo del cual se obtuvo la secuencia de referencia. Sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Las sustituciones también pueden hacerse en base a la hidrofobicidad o

hidrofilicidad conservada (Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. (1982) 157: 105-132), o en base a la capacidad de asumir estructura secundaria polipeptídica similar (Chou y Fasman, Adv. Enzymol. (1978) 47: 45-148, 1978).

Los homólogos pueden ser el resultado de variación alélica natural o mutación natural. Una variante alélica de origen natural de un ácido nucleico que codifica una proteína es un gen que existe en esencialmente el mismo locus (o loci) en el genoma que el gen que codifica dicha proteína, pero que, debido a variaciones naturales causadas por, por ejemplo, mutación o recombinación, tiene una secuencia similar pero no idéntica. Las variantes alélicas típicamente codifican proteínas que tienen actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el cual se están comparando. Una clase de variantes alélicas puede codificar la misma proteína, pero tener diferentes secuencias de ácido nucleico debido a la degeneración del código genético. Las variantes alélicas también pueden comprender alteraciones en las regiones no traducidas 5' o 3' del gen (por ejemplo, en regiones de control reguladoras). Las variantes alélicas son bien conocidas para los expertos en la materia.

Pueden producirse homólogos usando técnicas conocidas en la técnica para la producción de proteínas incluyendo, aunque sin limitación, modificaciones directas en la proteína aislada de origen natural, síntesis directa de proteínas, o modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas clásicas o recombinantes de ADN para lograr mutagénesis aleatoria o dirigida.

Las modificaciones o mutaciones en homólogos proteicos, en comparación con la proteína de tipo silvestre, aumentan, disminuyen, o no cambian sustancialmente, la actividad biológica básica del homólogo en comparación con la proteína de origen natural (de tipo silvestre). Con respecto a Cistatina C, la presente invención incluye homólogos que mantienen las actividades biológicas básicas de la proteína de tipo silvestre, así como homólogos que mantienen solamente algunas de las actividades biológicas de la proteína de tipo silvestre (por ejemplo, la capacidad de regular la actividad de TGF- β , pero no la actividad de cathepsina B). Un ejemplo de dicho homólogo se describe en los Ejemplos (es decir, la proteína modificada $\Delta 14\text{CystC}$). Las actividades biológicas de Cistatina C se han descrito en detalle en otra parte en este documento. Las modificaciones de una proteína, tal como en un homólogo o mimético (analizados a continuación), pueden producir proteínas que tienen la misma actividad biológica que la proteína de origen natural, o proteínas que tienen actividad biológica disminuida o aumentada en comparación con la proteína de origen natural. Las modificaciones que producen una disminución en la expresión de proteínas o una disminución en la actividad de la proteína, pueden mencionarse como inactivación (completa o parcial), regulación negativa, o acción disminuida (o actividad) de una proteína. Asimismo, modificaciones que producen un aumento en la expresión de proteínas o un aumento en la actividad de la proteína, pueden mencionarse como amplificación, sobreproducción, activación, potenciación, regulación positiva o acción aumentada (o actividad) de una proteína. Se aprecia que referencias generales a un homólogo que tiene la actividad biológica de la proteína de tipo silvestre no significan necesariamente que el homólogo tenga actividad biológica idéntica a la proteína de tipo silvestre, particularmente con respecto al nivel de actividad biológica. En su lugar, un homólogo puede realizar la misma actividad biológica general que la proteína de tipo silvestre, pero a un nivel reducido o aumentado de actividad en comparación con la proteína de tipo silvestre. Un dominio funcional de una proteína Cistatina C es un dominio (es decir, un dominio puede ser una parte de una proteína) que es capaz de realizar una función biológica (es decir, tiene actividad biológica, tal como la capacidad de unirse a un receptor de TGF- β , incluyendo T β R-II).

En una realización preferida de la presente invención, un homólogo de CystC tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cistatina C de tipo silvestre por una alteración (por ejemplo, delección, sustitución, inserción) de la secuencia de tipo silvestre suficiente para reducir o suprimir la actividad biológica del motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado. De acuerdo con la presente invención, el motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado de CystC humana, por ejemplo, está localizado entre aproximadamente la posición 80 y aproximadamente la posición 93 de CystC. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del homólogo difiere de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cistatina C de tipo silvestre por una delección de restos de aminoácido desde aproximadamente la posición 70 hasta aproximadamente la posición 100, o desde aproximadamente la posición 80 hasta aproximadamente la posición 93, con referencia a la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de CystC humana. También se abarcan delecciones de cualquier longitud entre aproximadamente la posición 50 y 120 que incluyen la delección desde aproximadamente la posición 80 hasta aproximadamente la posición 93, con referencia a la secuencia de aminoácidos de CystC humana (SEQ ID NO: 2). Una CystC humana que tiene una delección desde la posición 80 hasta la posición 93 se describe en los Ejemplos y se menciona en este documento como $\Delta 14\text{CystC}$. $\Delta 14\text{CystC}$ no se une a cathepsina B y, por lo tanto, no tiene la actividad inhibidora de cisteína proteasa de CystC de tipo silvestre. Sin embargo, $\Delta 14\text{CystC}$ retiene la capacidad de regular la actividad de TGF- β comparable con la proteína de tipo silvestre. Dicha actividad (o ausencia de la misma) puede usarse para evaluar otros mutantes de delección de CystC como se ha descrito anteriormente. Las posiciones correspondientes en otras proteínas CystC de otras especies pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, por alineación de la secuencia humana, con la otra secuencia (descrita en otra parte en este documento). Con respecto a la actividad reguladora de TGF- β de CystC, el presente inventor ha determinado que esta actividad está correlacionada con restos en la región C-terminal de CystC. Por lo tanto, un homólogo de CystC de la invención (incluyendo un fragmento biológicamente activo de la misma) retiene preferiblemente la parte C-terminal de la proteína de tipo silvestre, y muy preferiblemente, al menos los últimos 50 aminoácidos C-terminales, o al menos los últimos 45 aminoácidos C-terminales, de la secuencia de tipo silvestre. La retención de la actividad

reguladora de TGF- β de un homólogo de CystC puede evaluarse fácilmente, por ejemplo, determinando si el homólogo puede unirse a un receptor de TGF- β tal como T β R-II (descrito en este documento).

En una realización de la invención, un homólogo de CystC útil en los métodos de la invención incluye un fragmento. En una realización, el fragmento difiere de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre por una delección, de al menos aproximadamente 30 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 35 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 40 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 45 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 50 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 55 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 60 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 65 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 70 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 80 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 85 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 90 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 95 aminoácidos desde el extremo N-terminal, o una delección de al menos aproximadamente 100 aminoácidos desde el extremo N-terminal de la proteína CystC de tipo silvestre.

La descripción se refiere a un homólogo de CystC que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 55 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 60 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 65 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 70 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 75 % idéntica, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 85 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 96 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 97 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 98 % idéntica, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % idéntica (o cualquier porcentaje entre el 60 % y el 90 %, en incrementos de porcentaje individuales completos) a la secuencia de aminoácidos de referencia natural (por ejemplo, la proteína CystC de tipo silvestre, tal como la representada por la SEQ ID NO: 2) sobre una longitud de la secuencia natural que es al menos la misma que la longitud del homólogo. Un homólogo incluye un fragmento de una proteína natural (secuencia de longitud completa o de tipo silvestre), incluyendo formas biológicamente activas, parcialmente activas biológicamente (por ejemplo, se une aun ligando o receptor, pero puede no tener actividad biológica adicional), biológicamente inactivas, y formas solubles de la proteína natural (por ejemplo, si la proteína natural es una proteína de membrana o insoluble). Un homólogo de CystC de la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es menos del 100 % idéntica a la secuencia de tipo silvestre de CystC, o menos de aproximadamente el 99 % idéntica, o menos del 98 % idéntica, o menos del 97 % idéntica, o menos del 96 % idéntica, o menos del 95 % idéntica, o menos del 94 % idéntica, o menos del 93 % idéntica, o menos del 92 % idéntica, o menos del 91 % idéntica, o menos del 90 % idéntica a la secuencia de CystC de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). Como se usa en este documento, salvo que se especifique de otro modo, referencias a un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de homología que se realiza usando una búsqueda de homología BLAST. Las búsquedas de homología BLAST pueden realizarse usando la base de datos y el software BLAST, que ofrece programas de búsqueda incluyendo: (1) una búsqueda de homología BLAST 2.0 Basic BLAST usando blastp para búsquedas de aminoácidos y blastn para búsquedas de ácidos nucleicos con parámetros convencionales por defecto, donde la secuencia de consulta se filtra para regiones de baja complejidad por defecto (descrito en Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, incorporado en este documento por referencia en su totalidad); (2) una alineación BLAST 2 (usando los parámetros descritos a continuación); (3) y/o PSI-BLAST con los parámetros convencionales por defecto (Position-Specific Iterated BLAST). Se aprecia que debido a algunas diferencias en los parámetros convencionales entre BLAST 2.0 Basic BLAST y BLAST 2, podrían reconocerse dos secuencias específicas como si tuvieran homología significativa usando el programa BLAST 2, mientras que una búsqueda realizada en BLAST 2.0 Basic BLAST usando una de las secuencias como secuencia de consulta no puede identificar la segunda secuencia en las coincidencias superiores.

Dos secuencias específicas pueden alinearse entre sí usando la secuencia BLAST 2 como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250.

La alineación de secuencia BLAST 2 se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda Gapped BLAST (BLAST 2.0) entre las dos secuencias permitiendo la introducción de huecos (delecciones e inserciones) en la alineación resultante. Por motivos de claridad en este documento, la alineación de secuencia BLAST 2 se realiza usando los siguientes parámetros convencionales por defecto.

Para blastn, usando la matriz 0 BLOSUM62:

Recompensa por coincidencia = 1

Penalización por desapareamiento = -2

Penalizaciones por abertura de hueco (5) y extensión de hueco (2)

filtro (activo) de hueco x_disminución (50) esperada (10) de tamaño de palabra (11)

Para blastp, usando la matriz 0 BLOSUM62:

Penalizaciones por abertura de hueco (11) y extensión de hueco (1)

filtro (activo) de hueco x_disminución (50) esperada (10) de tamaño de palabra (11).

Además, PSI-BLAST proporciona una versión automatizada fácil de usar de una búsqueda de "perfil", que es un modo sensible de buscar homologías de secuencia. El programa primero realiza una búsqueda en base de datos gapped BLAST. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineación significativa devuelta para construir una matriz de valores específicos de posición, que reemplaza la secuencia de consulta para la siguiente ronda de búsqueda en base de datos. Por lo tanto, debe entenderse que el porcentaje de identidad puede determinarse usando uno cualquiera de estos programas, aunque para la comparación directa de dos secuencias, se prefiere BLAST 2.

De acuerdo con la presente invención, el término "contigua" o "consecutiva", con respecto a secuencias de ácido nucleico o aminoácidos descritas en este documento, significa conectadas en una secuencia ininterrumpida. Por ejemplo, para que una primera secuencia comprenda 30 aminoácidos contiguos (o consecutivos) de una segunda secuencia, significa que la primera secuencia incluye una secuencia ininterrumpida de 30 restos de aminoácido que es 100% idéntica a una secuencia ininterrumpida de 30 restos de aminoácido en la segunda secuencia. Asimismo, para que una primera secuencia tenga "100 % de identidad" con una segunda secuencia significa que la primera secuencia coincide exactamente con la segunda secuencia sin huecos entre nucleótidos o aminoácidos.

En otra realización, un homólogo de proteína aislada de la presente invención, incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es suficientemente similar a una secuencia de aminoácidos de proteína de origen natural que una secuencia de ácido nucleico que codifica el homólogo, esa secuencia de ácido nucleico que codifica el homólogo es capaz de hibridar en condiciones de rigurosidad moderada, alta, o muy alta (descritas a continuación) a (es decir, con) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de origen natural (es decir, con el complemento de la hebra de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de origen natural). Un "complemento" de secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico de la hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra que codifica la proteína. Son bien conocidos para los expertos en la materia los métodos para deducir una secuencia complementaria. Debe apreciarse que como las tecnologías de secuenciación de aminoácidos y secuenciación de ácidos nucleicos no están completamente libres de errores, las secuencias presentadas en este documento, en el mejor de los casos, representan secuencias aparentes de dominios PUFA PKS y proteínas de la presente invención.

Como se usa en este documento, condiciones de hibridación se refiere a condiciones convencionales de hibridación en que se usan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas similares de ácido nucleico. Dichas condiciones convencionales se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook *et al.*, *ibid* (véase específicamente, las páginas 9.31-9.62). Además, se describen fórmulas para calcular las condiciones apropiadas de hibridación y lavado para conseguir grados variables de desapareamiento de nucleótidos que permitan la hibridación, por ejemplo, en Meinkoth *et al.*, 1984, Anal. Biochem. 138, 267-284; Meinkoth *et al.*, *ibid.*, que se incorpora por referencia en este documento en su totalidad.

Más particularmente, condiciones de hibridación y lavado de baja rigurosidad, como se menciona en este documento, se refiere a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos un 50 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que se usa como sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 50 % o menos de desapareamiento de nucleótidos). Condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad moderada, como se menciona en este documento, se refiere a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que se usa como sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 30 % o menos de desapareamiento de nucleótidos). Condiciones de hibridación y lavado de alta rigurosidad, como se menciona en este documento, se refiere a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que se usa como sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 20 % o menos de desapareamiento de nucleótidos). Condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad muy alta, como se menciona en este documento, se refiere a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que se usa como sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 10 % o menos de desapareamiento de nucleótidos). Como se ha analizado anteriormente, un experto en la materia puede usar las fórmulas de Meinkoth *et al.*, *ibid.* para calcular las

condiciones apropiadas de hibridación y lavado para conseguir estos niveles particulares de desapareamiento de nucleótidos. Dichas condiciones variarán, dependiendo de si se están formando híbridos ADN:ARN o ADN:ADN. Las temperaturas de fusión calculadas para híbridos de ADN:ADN son 10EC menores para híbridos ADN:ARN. En realizaciones particulares, condiciones rigurosas de hibridación para híbridos de ADN:ADN incluyen hibridación a una fuerza iónica de SSC 6X (Na^+ 0,9 M) a una temperatura entre aproximadamente 20EC y aproximadamente 35EC (rigurosidad menor), más preferiblemente, entre aproximadamente 28EC y aproximadamente 40EC (más riguroso), e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 35EC y aproximadamente 45EC (incluso más riguroso), con condiciones apropiadas de lavado. En realizaciones particulares, las condiciones rigurosas de hibridación para híbridos de ADN:ARN incluyen hibridación a una fuerza iónica de SSC 6X (Na^+ 0,9 M) a una temperatura entre aproximadamente 30EC y aproximadamente 45EC, más preferiblemente, entre aproximadamente 38EC y aproximadamente 50EC, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 45EC y aproximadamente 55EC, con condiciones de lavado igualmente rigurosas. Estos valores se basan en cálculos de una temperatura de fusión para moléculas mayores de aproximadamente 100 nucleótidos, formamida al 0 % y un contenido de G + C de aproximadamente el 40 %. Como alternativa, la T_m puede calcularse de forma empírica como se expone en Sambrook *et al.*, *supra*, páginas 9.31 a 9.62. En general, las condiciones de lavado deben ser lo más rigurosas posible, y deben ser apropiadas para las condiciones elegidas de hibridación. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden incluir una combinación de condiciones salinas y de temperatura que son aproximadamente 20-25EC por debajo de la T_m calculada de un híbrido particular, y las condiciones de lavado típicamente incluyen una combinación de condiciones salinas y de temperatura que son aproximadamente 12-20EC por debajo de la T_m calculada del híbrido particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación adecuadas para su uso con híbridos de ADN:ADN incluye una hibridación de 2-24 horas en SSC 6X (formamida al 50 %) a aproximadamente 42EC, seguido por etapas de lavado que incluyen uno o más lavados a temperatura ambiente en SSC aproximadamente 2X, seguido por lavados adicionales a temperaturas mayores y menor fuerza iónica (por ejemplo, al menos un lavado de aproximadamente 37EC en SSC aproximadamente 0,1X-0,5X seguido por al menos un lavado a aproximadamente 68EC en SSC aproximadamente 0,1X-0,5X).

Las proteínas de la presente invención también incluyen productos de expresión de fusiones génicas (por ejemplo, usadas para sobreexpresar formas activas solubles de la proteína recombinante), de genes mutagenizados (tales como genes que tienen modificaciones de codones para potenciar la transcripción y traducción génica), y de genes truncados (tales como genes que tienen dominios de unión a membrana retirados para generar formas solubles de la proteína de membrana, o genes que tienen secuencias señal retiradas que son mal toleradas en un hospedador de recombinante particular).

La presente invención también incluye una proteína de fusión o una proteína quimérica que incluye un dominio que contiene proteína deseada (por ejemplo, homólogo de CystC o fragmento del mismo) unido a uno o más segmentos de fusión o proteínas o péptidos adicionales. Los segmentos de fusión adecuados para su uso con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, segmentos que pueden: potenciar la estabilidad de una proteína; proporcionar otra actividad biológica deseable; y/o ayudar con la purificación de una proteína (por ejemplo, por cromatografía de afinidad), o proporcionar otra función proteica (por ejemplo, como en una proteína quimérica). Un segmento de fusión adecuado puede ser un dominio de cualquier tamaño que tenga la función deseada (por ejemplo, confiere estabilidad, solubilidad, acción o actividad biológica aumentada; simplifica la purificación de una proteína; o proporciona la función proteica adicional). Los segmentos de fusión pueden unirse a los extremos amino y/o carboxilo del dominio de la proteína deseada y pueden ser susceptibles a escisión para posibilitar la recuperación directa de la proteína. En una realización, un segmento o proteína de fusión adecuado con el que puede producirse una proteína quimérica o de fusión es un fragmento de anticuerpo y, particularmente, la parte Fc de una proteína de inmunoglobulina. Cualquier compañero de fusión o quimera que potencie la estabilidad o semivida de CystC *in vivo*, por ejemplo, se contempla para su uso en la presente invención.

En una realización de la presente invención, puede producirse cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente para homólogos, con de al menos uno, y hasta aproximadamente 20, aminoácidos heterólogos adicionales flanqueando cada uno del extremo C-terminal y/o N-terminal de la secuencia dada de aminoácidos. La proteína o polipéptido de resultante puede mencionarse como "que consiste esencialmente en" una secuencia dada de aminoácidos. De acuerdo con la presente invención, los aminoácidos heterólogos son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran de forma natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia dada de aminoácidos o que no estaría codificada por los nucleótidos que flanquean la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la secuencia dada de aminoácidos como aparece en el gen, si dichos nucleótidos en la secuencia de origen natural se traducen usando el uso convencional de codones para el organismo del cual se obtiene la secuencia dada de aminoácidos. Asimismo, la expresión "que consiste esencialmente en", cuando se usa con referencia a una secuencia de ácido nucleico en este documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dada de aminoácidos que puede estar flanqueada por de al menos uno, y hasta como mucho aproximadamente 60, nucleótidos heterólogos adicionales en cada uno del extremo 5' y/o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia dada de aminoácidos. Los nucleótidos heterólogos no se encuentran de forma natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia dada de aminoácidos como aparece en el gen natural.

El tamaño mínimo de un homólogo de proteína o fragmento del mismo de la presente invención es, en un aspecto, un tamaño suficiente para tener la actividad biológica necesaria, o suficiente para servir como antígeno para la generación de un anticuerpo o como una diana en un ensayo *in vitro*. En una realización, una proteína de la presente invención es de al menos aproximadamente o al menos aproximadamente de 40 aminoácidos de longitud, o de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 65 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 85 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 95 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 105 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 115 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 120 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 125 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 130 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 140 aminoácidos de longitud, y así, en cualquier longitud entre 8 aminoácidos y hasta la longitud completa de una proteína de la invención o más larga, en enteros completos (por ejemplo, 8, 9, 10,...25, 26,...102, 103,...). No existe límite, diferente a un límite práctico, sobre el tamaño máximo de dicha proteína porque la proteína puede incluir una parte de una proteína, un dominio funcional, o un fragmento biológicamente activo o útil de la misma, o una proteína de longitud completa, más secuencia adicional (por ejemplo, una secuencia proteica de fusión), si se desea.

La presente descripción también se refiere a una composición que comprende al menos aproximadamente 500 ng, al menos aproximadamente 1 µg, al menos aproximadamente 5 µg, al menos aproximadamente 10 µg, al menos aproximadamente 25 µg, al menos aproximadamente 50 µg, al menos aproximadamente 75 µg, al menos aproximadamente 100 µg, al menos aproximadamente 250 µg, al menos aproximadamente 500 µg, al menos aproximadamente 750 µg, al menos aproximadamente 1 mg, o al menos aproximadamente 5 mg, de un homólogo de proteína CystC aislado que comprende cualquiera de los homólogos de CystC de la misma analizados en este documento. Dicha composición de la presente invención puede incluir cualquier vehículo con el que se asocie la proteína en virtud del método de preparación proteica, un método de purificación de proteínas, o una preparación de la proteína para su uso en un método *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, dicho vehículo puede incluir cualquier excipiente adecuado, tampón y/o vehículo de suministro, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable (analizado a continuación), que es adecuado para combinar con la proteína CystC de la presente invención de modo que la proteína pueda usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de acuerdo con la presente invención.

Los homólogos de una proteína descritos en este documento tales como homólogos de CystC, incluyendo agonistas y antagonistas peptídicos y no peptídicos de CystC, pueden ser productos de diseño de fármacos o selección y pueden producirse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Dichos homólogos pueden mencionarse más particularmente como miméticos. Un mimético se refiere a cualquier compuesto peptídico o no peptídico que sea capaz de imitar la acción biológica de un péptido de origen natural, a menudo porque el mimético tiene una estructura básica que imita la estructura básica del péptido de origen natural y/o tiene las propiedades biológicas destacadas del péptido de origen natural. Los miméticos pueden incluir, aunque sin limitación: péptidos que tienen modificaciones sustanciales a partir del prototipo tal como ausencia de similitud de cadena lateral con el péptido de origen natural (dichas modificaciones, por ejemplo, pueden disminuir su susceptibilidad a la degradación); anticuerpos anti-idiotípicos y/o catalíticos, o fragmentos de los mismos; partes no proteicas de una proteína aislada (por ejemplo, estructuras de carbohidrato); o moléculas sintéticas u orgánicas naturales, incluyendo ácidos nucleicos y fármacos identificados a través de química combinatoria, por ejemplo. Dichos miméticos pueden diseñarse, seleccionarse y/o identificarse de otro modo usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Se describen diversos métodos de diseño de fármacos, útiles para diseñar o seleccionar miméticos u otros compuestos terapéuticos útiles en la presente invención en Maulik *et al.*, 1997, Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies, Wiley-Liss, Inc.

Un agonista puede ser cualquier compuesto que sea capaz de imitar, duplicar o aproximarse a la actividad biológica de una proteína de origen natural o específica, por ejemplo, por asociación con (por ejemplo, unión a) o activación de una proteína (por ejemplo, un receptor) al cual se une la proteína natural, de modo que la actividad que se produciría con la proteína natural se estimula, induce, aumenta, o potencia. Por ejemplo, un agonista puede incluir, aunque sin limitación, una proteína, compuesto, o un anticuerpo que se une selectivamente a y activa o aumenta la activación de un receptor unido por la proteína natural, otros homólogos de la proteína natural, y cualquier producto adecuado de diseño de fármacos que se caracterice por su capacidad de agonizar (por ejemplo, estimular, inducir, aumentar, potenciar) la actividad biológica de una proteína de origen natural.

Un antagonista se refiere a cualquier compuesto o agente que sea capaz de actuar de un modo que sea antagonista (por ejemplo, contra, de forma inversa a, contrario a) a la acción del agonista natural, por ejemplo, por interacción con otra proteína o molécula de un modo que se disminuya la actividad biológica de la proteína o agonista de origen natural (por ejemplo, reduzca, inhiba, bloquee). Dicho compuesto puede incluir, aunque sin limitación, un anticuerpo que se una selectivamente a y bloquee el acceso a una proteína por su ligando natural, o reduzca o inhiba la actividad de una proteína, o producto de diseño de fármacos que bloquee la proteína o reduzca la actividad biológica

de la proteína, una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína o evita la expresión de la proteína, una ribozima que se une al ARN y evita la expresión de la proteína, y una proteína soluble, que compite con un receptor o ligando natural.

Un mimético, incluyendo agonistas y antagonistas, puede producirse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Un mimético puede obtenerse, por ejemplo, a partir de estrategias de diversidad molecular (una combinación de estrategias relacionadas que permiten la rápida construcción de bibliotecas grandes de moléculas químicamente diversas), bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos, en particular de bibliotecas químicas o combinatorias (es decir, bibliotecas de compuestos que difieren en secuencia o tamaño pero que tienen los componentes básicos similares) o por diseño racional, dirigido o aleatorio de fármacos. Véase, por ejemplo, Maulik *et al.*, *supra*.

En una estrategia de diversidad molecular, se sintetizan grandes bibliotecas de compuestos, por ejemplo, a partir de péptidos, oligonucleótidos, carbohidratos y/o moléculas orgánicas sintéticas, usando enfoques biológicos, enzimáticos y/o químicos. Los parámetros críticos en el desarrollo de una estrategia de diversidad molecular incluyen la diversidad de subunidad, el tamaño molecular, y la diversidad de biblioteca. El objetivo general de la exploración de dichas bibliotecas es utilizar la aplicación secuencial de selección combinatoria para obtener ligandos de alta afinidad para una diana deseada, y después optimizar las moléculas principales por estrategias de diseño aleatorio o dirigido. Se describen métodos de diversidad molecular en detalle en Maulik, *et al.*, *ibid*.

Maulik, *et al.* también describen, por ejemplo, métodos de diseño dirigido, en que el usuario dirige el proceso de creación de moléculas novedosas a partir de una biblioteca de fragmentos de fragmentos apropiadamente seleccionados; diseño aleatorio, en que el usuario usa un algoritmo genético u otro algoritmo para mutar aleatoriamente fragmentos y sus combinaciones aplicando simultáneamente un criterio de selección para evaluar la aptitud de los ligandos candidatos; y un enfoque basado en cuadrícula en que el usuario calcula la energía de interacción entre estructuras tridimensionales del receptor y pequeñas sondas de fragmento pequeño, seguido por unión conjunta de sitios favorables de sonda.

Una realización de la presente invención se refiere a moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas homólogas descritas en este documento, o fragmento de cualquiera de dichas proteínas, así como secuencias de ácido nucleico que son completamente complementarias a las mismas. De acuerdo con la presente invención, una molécula aislada de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Por tanto, "aislado" no refleja necesariamente el grado al cual se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Una molécula aislada de ácido nucleico puede incluir un gen. Una molécula aislada de ácido nucleico que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que en su lugar incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales que se encuentran de forma natural en el mismo cromosoma. Una molécula aislada de ácido nucleico también puede incluir una secuencia específica de ácido nucleico flanqueada por (es decir, en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia) ácidos nucleicos adicionales que no flanquean normalmente la secuencia específica de ácido nucleico en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula aislada de ácido nucleico puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm), o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos expresiones pueden usarse de forma intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que es capaz de codificar una proteína o dominio de una proteína.

Preferiblemente, una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención se produce usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Las moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen moléculas naturales de ácido nucleico y homólogos de las mismas incluyendo, aunque sin limitación, variantes alélicas naturales y moléculas modificadas de ácido nucleico en que se han insertado, delecionado, sustituido y/o invertido nucleótidos de tal modo que dichas modificaciones proporcionen el efecto deseado sobre la actividad biológica de la proteína como se describe en este documento. Se han analizado homólogos de proteína (por ejemplo, proteínas codificadas por homólogos de ácido nucleico) en detalle anteriormente.

Puede producirse un homólogo de molécula de ácido nucleico usando varios métodos conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989). Por ejemplo, pueden modificarse moléculas de ácido nucleico usando una diversidad de técnicas incluyendo, aunque sin limitación, técnicas clásicas de mutagénesis y técnicas de ADN recombinante, tal como mutagénesis dirigida al sitio, tratamiento químico de una molécula de ácido nucleico para inducir mutaciones, escisión con enzimas de restricción de un fragmento de ácido nucleico, ligamiento de fragmentos de ácido nucleico, amplificación por PCR y/o mutagénesis de regiones seleccionadas de una secuencia de ácido nucleico, síntesis de

mezclas de oligonucleótidos y ligamiento de grupos mixtos para "construir" una mezcla de moléculas de ácido nucleico y combinaciones de las mismas. Los homólogos de molécula de ácido nucleico pueden seleccionarse a partir de una mezcla de ácidos nucleicos modificados explorando la función de la proteína codificada por el ácido nucleico y/o por hibridación con un gen de tipo silvestre.

El tamaño mínimo de una molécula de ácido nucleico de la presente invención es un tamaño suficiente para codificar una proteína que tiene la actividad biológica deseada, o suficiente para formar una sonda o cebador oligonucleotídico que sea capaz de formar un híbrido estable con la secuencia complementaria de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína natural (por ejemplo, en condiciones de rigurosidad moderada, alta, o muy alta). Por tanto, el tamaño de la molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína puede depender de la composición de ácido nucleico y el porcentaje de homología o identidad entre la molécula de ácido nucleico y la secuencia complementaria, así como de las condiciones de hibridación *per se* (por ejemplo, temperatura, concentración salina, y concentración de formamida). El tamaño mínimo de una molécula de ácido nucleico que se usa como cebador oligonucleotídico o como sonda es típicamente de al menos aproximadamente 12 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud si las moléculas de ácido nucleico son ricas en GC y de al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 18 bases de longitud si son ricas en AT. No existe límite, diferente al límite práctico, sobre el tamaño máximo de una molécula de ácido nucleico de la presente invención, porque la molécula de ácido nucleico puede incluir una parte de una secuencia que codifica proteína o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa.

Una realización de la presente invención es una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención. De acuerdo con la presente invención, una molécula de ácido nucleico recombinante incluye al menos una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención que está unida a una secuencia heteróloga de ácido nucleico. Dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico es típicamente un vector de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un vector recombinante) que es adecuado para clonación, secuenciación, y/o manipulación de otro modo de la molécula de ácido nucleico, tal como mediante la expresión y/o suministro de la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora para formar una célula recombinante. Dicho vector contiene secuencias heterólogas de ácido nucleico, es decir, secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de forma natural adyacentes a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, aunque el vector también puede contener secuencias reguladoras de ácido nucleico (por ejemplo, promotores, regiones no traducidas) que se encuentran de forma natural adyacentes a moléculas de ácido nucleico de la presente invención (analizadas en detalle a continuación). El vector puede ser ARN o ADN, procariota o eucariota, y típicamente es un virus o un plásmido. El vector puede mantenerse como un elemento extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o puede integrarse en el cromosoma. El vector completo puede permanecer en su sitio dentro de una célula hospedadora, o en ciertas condiciones, el ADN plasmídico puede eliminarse, dejando detrás la molécula de ácido nucleico de la presente invención. La molécula integrada de ácido nucleico puede estar bajo el control del promotor cromosómico, bajo el control del promotor nativo o plasmídico, o bajo el control de una combinación de varios promotores. Puede integrarse una única copia o múltiples copias de la molécula de ácido nucleico en el cromosoma. Como se usa en este documento, la expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se usa principalmente para hacer referencia a un vector recombinante en que se ha ligado la secuencia de ácido nucleico a clonar, manipular, transformar en la célula hospedadora (es decir, el inserto).

En una realización, un vector recombinante de la presente invención es un vector de expresión, de modo que la molécula de ácido nucleico recombinante producida por inserción de una molécula de ácido nucleico en el vector pueda usarse para expresar o producir la proteína codificada por el inserto de molécula de ácido nucleico. Como se usa en este documento, la expresión "vector de expresión" se usa para hacer referencia a un vector que es adecuado para la producción de un producto codificado (por ejemplo, una proteína de interés). Más particularmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica el producto a producirse se inserta en el vector recombinante para producir una molécula de ácido nucleico recombinante. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína a producirse se inserta en el vector de un modo que una de forma funcional la secuencia de ácido nucleico a secuencias reguladoras en el vector (por ejemplo, secuencias de control de la expresión) que posibilitan la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico cuando se introduce la molécula recombinante en una célula hospedadora.

En otra realización, un vector recombinante usado en una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención es un vector de direccionamiento. Como se usa en este documento, la expresión "vector de direccionamiento" se usa para hacer referencia a un vector que se usa para suministrar una molécula de ácido nucleico particular en una célula hospedadora recombinante, donde la molécula de ácido nucleico se usa para delecionar o inactivar un gen endógeno dentro de la célula hospedadora (es decir, se usa para la alteración génica dirigida o tecnología knock-out) y/o para insertar o reemplazar un nuevo gen o molécula de ácido nucleico exógeno en el genoma de la célula hospedadora.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "unido de forma funcional" se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, una secuencia de control de la transcripción y/o una secuencia de control de la traducción) de un modo tal que la molécula pueda expresarse cuando se introduce por transfección (es decir, se introduce por transformación, transducción, transfección,

conjugación o inducción) en una célula hospedadora. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, elongación, o terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias adecuadas de control de la transcripción incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en una célula hospedadora en que se tiene que introducir la molécula de ácido nucleico recombinante.

Las moléculas recombinantes de la presente invención, que pueden ser ADN o ARN, también pueden contener secuencias reguladoras adicionales, tales como secuencias reguladoras de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante. En una realización, una molécula recombinante de la presente invención, incluyendo aquellas que se integran en el cromosoma de la célula hospedadora, también contiene señales de secreción (es decir, secuencias de ácido nucleico del segmento señal) para posibilitar que una proteína expresada se secrete desde la célula que produce la proteína. Los segmentos señal adecuados incluyen un segmento señal que está asociado de forma natural con una proteína de la presente invención o cualquier segmento señal heterólogo capaz de dirigir la secreción de una proteína de acuerdo con la presente invención.

Puede usarse una o más moléculas recombinantes de la presente invención para producir un producto codificado de la presente invención. En una realización, se produce un producto codificado expresando una molécula de ácido nucleico como se describe en este documento en condiciones eficaces para producir la proteína. Un método preferido para producir una proteína codificada es transfectando una célula hospedadora con una o más moléculas recombinantes para formar una célula recombinante. Las células hospedadoras adecuadas a transfectar incluyen, aunque sin limitación, cualquier célula bacteriana, fúngica (por ejemplo, de levadura), de insecto, vegetal o animal que pueda transfectarse. Las células hospedadoras pueden ser células no transfectadas o células que ya se han transfectado con al menos una molécula de ácido nucleico.

De acuerdo con la presente invención, el término "transfección" se usa para hacer referencia a cualquier método por el cual pueda insertarse una molécula exógena de ácido nucleico (es decir, una molécula de ácido nucleico recombinante) en la célula. El término "transformación" puede usarse de forma intercambiable con el término "transfección" cuando dicho término se usa para hacer referencia a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como bacterias y levaduras. En sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio hereditario debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencial sinónimo del término "transfección". Sin embargo, en células animales, la transformación ha adquirido un segundo significado que puede hacer referencia a cambios en las propiedades de crecimiento de las células en cultivo después de haberse vuelto cancerosas, por ejemplo. Por lo tanto, para evitar la confusión, el término "transfección" se usa preferiblemente con respecto a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en células animales, y el término "transfección", se usará en este documento para abarcar de forma general tanto la transfección de células animales como la transformación de células microbianas, en la medida que los términos corresponden a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en una célula. Por lo tanto, las técnicas de transfección incluyen, aunque sin limitación, transformación, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

En una realización, se produce una proteína de la presente invención cultivando una célula que expresa la proteína en condiciones eficaces para producir la proteína, y recuperando la proteína. Una célula preferida a cultivar es una célula recombinante de la presente invención. Las condiciones eficaces de cultivo incluyen, aunque sin limitación, condiciones de medios eficaces, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permite la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en que se cultiva una célula para producir una proteína de la presente invención. Dicho medio típicamente comprende un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Ejemplos de medios y condiciones de cultivo adecuados se analizan en detalle en la sección de Ejemplos. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores convencionales de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri. El cultivo puede realizarse a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Dichas condiciones de cultivo pertenecen a la experiencia de los expertos en la materia.

Dependiendo del sistema de vector y hospedador usado para la producción, las proteínas resultantes de la presente invención pueden permanecer dentro de la célula recombinante; secretarse al medio de cultivo; secretarse a un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o retenerse en la superficie exterior de una célula o membrana vírica. La expresión "recuperación de la proteína" se refiere a recoger el medio de cultivo completo que contiene la proteína y no necesita implicar etapas adicionales de separación o purificación. Las proteínas de la presente invención pueden purificarse usando una diversidad de técnicas convencionales de purificación de proteínas tales como, aunque sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía en concavina A, cromatografía de exclusión y solubilización diferencial.

Las proteínas de la presente invención se recuperan, obtienen y/o usan preferiblemente en forma "sustancialmente pura". Como se usa en este documento, "sustancialmente pura", se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de acuerdo con la presente invención. Para que una proteína sea útil en un método *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de acuerdo con la presente invención, están sustancialmente libre de contaminantes, otras proteínas y/o agentes químicos que podrían interferir o que interferirían con su uso en un método descrito por la presente invención, o que al menos serían indeseables para su inclusión con la proteína cuando se usa en un método descrito por la presente invención. Dichos métodos incluyen producción de anticuerpos, ensayos de identificación de agonistas/antagonistas, preparación de composiciones terapéutica, administración en la composición terapéutica, y todos los demás métodos descritos en este documento. Preferiblemente, una proteína "sustancialmente pura", como se menciona en este documento, es una proteína que puede producirse por cualquier método (es decir, por purificación directa de una fuente natural, de forma recombinante o de forma sintética), y que se ha purificado de otros componentes proteicos de modo que la proteína comprenda al menos aproximadamente un 80 % en peso/peso de la proteína total en una composición dada, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 85 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 90 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 91 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 92 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 93 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 94 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 95 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 96 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 97 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 98 %, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 99 %, en peso/peso de la proteína total en una composición dada.

Por tanto, en una realización se proporciona un antagonista de CystC o inhibidor de CystC que provoca una disminución en al menos una actividad biológica de CystC como se describe en este documento. Dichos inhibidores incluyen, antagonistas de CystC (incluyendo homólogos de la proteína) que son inhibidores competitivos de CystC natural.

La presente descripción incluye una composición o formulación que comprende un fragmento u homólogo de CystC con fines de diagnóstico, exploración o terapéuticos. Por lo tanto, la descripción también se refiere a una composición que comprende un compuesto seleccionado de: (i) un homólogo aislado de CystC, (iii) una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica un homólogo de CystC. La composición típicamente también incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este aspecto de la presente invención, una proteína CystC aislada puede ser cualquiera de las proteínas CystC previamente descritas en este documento, un homólogo de la proteína CystC, un fragmento o una proteína de fusión de la misma. Las moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican un homólogo de CystC, un fragmento o proteína de fusión de la misma también se han descrito. En una realización, una composición de la presente invención incluye una combinación de al menos dos de cualquiera de los compuestos identificados anteriormente. Las composiciones y sus componentes pueden usarse en cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o terapéuticas de la invención descritas en este documento.

Una composición, y particularmente una composición terapéutica, de la presente descripción, incluyen generalmente un vehículo, y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con la presente invención, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos de suministro farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para su uso en la administración de la composición a un sitio adecuado *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de mantener una proteína, compuesto, o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en una forma que, tras la llegada de la proteína, compuesto, o molécula de ácido nucleico a la diana celular en un cultivo o en un paciente, la proteína, compuesto o molécula de ácido nucleico es capaz de interactuar con su diana.

Los excipientes adecuados de la presente invención incluyen excipientes o agentes de formulación que transportan o ayudan al transporte, pero no dirigen específicamente una composición a una célula (también mencionados en este documento como vehículos no de direccionamiento). Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, aceites, ésteres y glicoles. Los vehículos acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas del destinatario, por ejemplo, potenciando la estabilidad química y la isotonicidad.

Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris, y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol benzol. Las composiciones de la presente invención pueden esterilizarse por métodos convencionales y/o liofilizarse.

Un tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable incluye una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un paciente o cultivo. Como se usa en este documento, una formulación de liberación controlada comprende un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un homólogo de la proteína, un fármaco, una molécula de ácido nucleico) en un vehículo de liberación

controlada. Los vehículos de liberación controlada adecuados incluyen, aunque sin limitación, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones en bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de suministro transdérmico. Otros vehículos de la presente invención incluyen líquidos que, tras la administración a un paciente, forman un sólido o un gel *in situ*. Los vehículos preferidos también son biodegradables (es decir, bioerosionables). Cuando el compuesto es una molécula de ácido nucleico recombinante, los vehículos adecuados de suministro incluyen, aunque sin limitación, liposomas, vectores víricos y otros vehículos de suministro, incluyendo ribozimas. Los vehículos de suministro que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de suministro de la presente invención puede modificarse para dirigirse a un sitio particular en un paciente, abordando de ese modo y haciendo uso de un compuesto de la presente invención en ese sitio. Modificaciones adecuadas incluyen la manipulación de la fórmula química de la parte lipídica del vehículo de suministro y/o la introducción en el vehículo de un agente de direccionamiento capaz de dirigir específicamente un vehículo de suministro a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo celular preferido. Otros vehículos de suministro adecuados incluyen partículas de oro, conjugados moleculares de poli-L-lisina/ADN, y cromosomas artificiales.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable que tiene capacidad de direccionamiento se menciona en este documento como un "vehículo de suministro". Los vehículos de suministro de la presente invención son capaces de suministrar una composición de la presente invención a un sitio diana en un paciente. Un "sitio diana" se refiere a un sitio en un paciente en el cual se desea suministrar una composición. Por ejemplo, un sitio diana puede ser cualquier célula que sea abordada por inyección o suministro directo usando liposomas, vectores víricos u otros vehículos de suministro, incluyendo ribozimas y anticuerpos. Ejemplos de vehículos de suministro incluyen, aunque sin limitación, vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales y naturales, vectores víricos, y ribozimas. Los vehículos de suministro que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de suministro de la presente invención puede modificarse para dirigirse a un sitio particular en un sujeto, dirigiendo de ese modo y haciendo uso de un compuesto de la presente invención en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipulación de la fórmula química de la parte lipídica del vehículo de suministro y/o la introducción en el vehículo de un compuesto capaz de dirigir específicamente un vehículo de suministro a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo celular preferido, tal como una célula tumoral. Específicamente, direccionamiento se refiere a causar que el vehículo de suministro se una a una célula particular mediante la interacción del compuesto en el vehículo con una molécula sobre la superficie de la célula. Los compuestos de direccionamiento adecuados incluyen ligandos capaces de unirse selectivamente (es decir, específicamente) a otra molécula en un sitio particular. Ejemplos de dichos ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos de receptores. La manipulación de la fórmula química de la parte lipídica del vehículo de suministro puede modular el direccionamiento extracelular o intracelular del vehículo de suministro. Por ejemplo, puede añadirse un agente químico a la fórmula lipídica de un liposoma que altera la carga de la bicapa lipídica del liposoma de modo que el liposoma se fusione con células particulares que tienen características particulares de carga.

Otro vehículo de suministro comprende un vector vírico. Un vector vírico incluye una molécula aislada de ácido nucleico útil en la presente invención, en que las moléculas de ácido nucleico se empaquetan en una cubierta vírica que permite la entrada del ADN en una célula. Pueden usarse varios vectores víricos incluyendo, aunque sin limitación, aquellos basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, lentivirus, virus adenoasociados y retrovirus.

Una realización de la presente invención es el uso de los homólogos de CystC descritos en este documento, solos o en una composición para la regulación de la actividad de TGF- β incluyendo la inhibición de la actividad de TGF- β . En realizaciones donde se inhibe la actividad de TGF- β , dichos métodos pueden ampliarse a métodos para inhibir neoplasias tumorales (incluyendo neoplasias metastásicas) o una afección o enfermedad proliferativa o fibrótica, y particularmente neoplasias tumorales o afecciones o enfermedades proliferativas o fibróticas que están mediadas al menos en parte por la expresión o actividad de TGF- β , y/o por la regulación por cathepsina B de la expresión o actividad de TGF- β . Los métodos que implican la inhibición de la actividad de TGF- β generalmente comprenden la administración a un paciente o, como alternativa, el contacto de una célula (aislada o *in vivo*), con homólogo de Cistatina C que tiene actividad biológica de Cistatina C o con una composición que comprende dichos agentes. Cuando la célula es una célula tumoral o el paciente tiene cáncer, el agente se administra preferiblemente en una cantidad eficaz para inhibir la actividad biológica de la actividad de TGF- β en la célula tumoral o en el microentorno de la célula tumoral.

Una composición que incluye un compuesto o agente regulador o proteína de la invención puede suministrarse a un cultivo celular o paciente mediante cualquier método adecuado. La selección de dicho método variará con el tipo de compuesto que se está administrando o suministrando (es decir, homólogo de la proteína, ácido nucleico), el modo de suministro (es decir, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*) y el objetivo a conseguir mediante la administración/suministro del compuesto o composición. De acuerdo con la presente invención, un protocolo eficaz de administración (es decir, administración de una composición de un modo eficaz) comprende parámetros adecuados de dosis y modos de administración que provocan el suministro de una composición a un sitio deseado.

Las vías de administración incluyen vías *in vivo*, *in vitro*, y *ex vivo*. Las vías *in vivo* incluyen, aunque sin limitación, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, suministro transdérmico, administración intratraqueal, administración subcutánea, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo, aerosol), administración intracraneal, intraespinal, intraocular, aural, intranasal, oral, pulmonar, impregnación de un catéter, e inyección directa en un tejido. En una realización preferida de la presente invención, se administra una composición mediante una vía parenteral (por ejemplo, vía subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal). Las administraciones intravenosas, intraperitoneales, intradérmicas, subcutáneas e intramusculares pueden realizarse usando métodos convencionales en la técnica. El suministro aural puede incluir gotas para los oídos, el suministro intranasal puede incluir gotas para la nariz o inyección intranasal, y el suministro intraocular puede incluir colirios. El suministro por aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad). El suministro oral puede realizarse formando complejos de una composición terapéutica de la presente invención con un vehículo capaz de soportar la degradación por las enzimas digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de dichos vehículos, incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. Las técnicas de inyección directa son particularmente útiles para suprimir el rechazo de injertos, por ejemplo, inyectando la composición en el tejido trasplantado, o para la administración específica de sitio de un compuesto, tal como en el sitio de un tumor.

Ex vivo se refiere a realizar parte de la etapa reguladora fuera del paciente, tal como transfectando una población de células retirada de un paciente con una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la presente invención en condiciones tales que la molécula recombinante se expresa posteriormente por la célula transfectada, y devolviendo las células transfectadas al paciente. Las vías de administración *in vivo* y *ex vivo* de una composición a un cultivo de células hospedadoras pueden conseguirse por un método que incluye, aunque sin limitación, transfección, transformación, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, fusión de protoplasto, uso de agentes de transporte de proteínas, uso de agentes de transporte de iones, uso de detergentes para permeabilización, y mezcla simple (por ejemplo, combinación) de un compuesto en cultivo con una célula diana y/o proteína diana.

Diversos métodos de administración y vehículos de suministro descritos en este documento han demostrado ser eficaces para el suministro de una molécula de ácido nucleico a una célula diana, mediante lo cual la molécula de ácido nucleico transfectaba la célula y se expresaba. En muchos estudios, se consiguió suministro y expresión satisfactoria de un gen heterólogo en tipos celulares preferidos y/o usando vehículos preferidos de suministro y vías de administración de la presente invención.

Por ejemplo, el uso del suministro en liposomas, patente de Estados Unidos n.º 5.705.151, expedida el 6 de enero de 1998, de Dow *et al.* demostró el suministro intravenoso satisfactorio *in vivo* de una molécula de ácido nucleico que codifica un superantígeno y una molécula de ácido nucleico que codifica una citoquina en un vehículo de suministro de liposoma catiónico, mediante lo cual se expresaron las proteínas codificadas en tejidos del animal, y particularmente en tejidos pulmonares. Además, Liu *et al.*, Nature Biotechnology 15:167, 1997, demostraron que el suministro intravenoso de liposomas catiónicos que contienen colesterol que contienen genes abordaban preferentemente tejidos pulmonares y mediaban de forma eficaz la transferencia y expresión de los genes *in vivo*. Varias publicaciones de Dzaú y colaboradores demuestran el suministro *in vivo* y expresión satisfactorios de un gen en células del corazón, incluyendo miocitos cardíacos y fibroblastos y células de músculo liso vascular usando tanto ADN desnudo como suministro por liposoma de virus hemaglutinante de Japón, administrados tanto por incubación dentro del pericardio como por infusión en una arteria coronaria (suministro intracoronario) (véase, por ejemplo, Aoki *et al.*, 1997, J. Mol. Cell, Cardiol. 29:949-959; Kaneda *et al.*, 1997, Ann N.Y. Acad. Sci. 811:299-308; y von der Leyen *et al.*, 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:1137-1141).

El suministro de numerosas secuencias de ácido nucleico se ha conseguido mediante la administración de vectores víricos que codifican las secuencias de ácido nucleico. Usando dichos vectores, se ha conseguido el suministro y expresión satisfactorios usando suministro *ex vivo* (véase, de muchos ejemplos, el vector retrovírico; Blaese *et al.*, 1995, Science 270:475-480; Bordignon *et al.*, 1995, Science 270:470-475), administración nasal (vector asociado a CFTR-adenovirus), administración intracoronaria (vector adenovírico y virus hemaglutinante de Japón, véase anteriormente), administración intravenosa (vector vírico adenoasociado; Koeberl *et al.*, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:1426-1431). Una publicación de Maurice *et al.* (1999, J. Clin. Invest. 104:21-29) demostró que un vector adenovírico que codifica un receptor β_2 adrenérgico, administrado por suministro intracoronario, provocaba expresión en miocardio multicámara difusa del gen *in vivo*, y posteriores aumentos significativos en la función hemodinámica y otros parámetros fisiológicos mejorados. Levine *et al.*, describen el suministro y expresión *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de un gen a adipocitos humanos y adipocitos de conejo usando un vector adenovírico e inyección directa de las construcciones en tejido adiposo (Levine *et al.*, 1998, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 44:569-572).

En el área de suministro génico neuronal, se ha informado de múltiples transferencias génicas *in vivo* satisfactorias. Millecamps *et al.*, informaron del direccionamiento de vectores adenovíricos a neuronas usando elementos potenciadores restrictivos de neuronas colocados cadena arriba del promotor para el transgén (promotor de

fosfoglicerato). Dichos vectores se administraron a ratones y ratas por vía intramuscular e intracerebral, respectivamente, provocando transfección y expresión específica neuronal satisfactoria del transgén *in vivo* (Millecamps *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol. 17:865-869). Como se ha analizado anteriormente, Bennett *et al.* informaron del uso de vector vírico adenoasociado para suministrar y expresar un gen por inyección subretiniana en la retina neural *in vivo* durante más de 1 año (Bennett, 1999, *ibid.*).

El suministro génico a células de revestimiento sinovial y articulaciones articuladas ha obtenido éxitos similares. Oligino y colaboradores informan del uso de un vector vírico del herpes simple que es deficiente para los genes tempranos inmediatos, ICP4, 22 y 27, para suministrar y expresar dos receptores diferentes en células de revestimiento sinovial *in vivo* (Oligino *et al.*, 1999, Gene Ther. 6:1713-1720). Los vectores de herpes se administraron por inyección intraarticular. Kuboki *et al.* usaron transferencia génica mediada por vector adenovírico e inyección intraarticular para expresar de forma satisfactoria y específica un gen en las articulaciones temporomandibulares de cobayas *in vivo* (Kuboki *et al.*, 1999, Arch. Oral. Biol. 44:701-709). Apparailly y colaboradores administraron de forma sistémica vectores adenovíricos que codificaban IL-10 a ratones y demostraron expresión satisfactoria del producto génico y profundos efectos terapéuticos en el tratamiento de artritis inducida de forma experimental (Apparailly *et al.*, 1998, J. Immunol. 160:5213-5220). En otro estudio, se usó el vector retrovírico basado en virus de leucemia murina para suministrar (por inyección intraarticular) y expresar un gen de hormona de crecimiento humana tanto *ex vivo* como *in vivo* (Ghivizzani *et al.*, 1997, Gene Ther. 4:977-982). Este estudio demostró que la expresión por transferencia génica *in vivo* era al menos equivalente a la de la transferencia génica *ex vivo*. Como se ha analizado anteriormente, Sawchuk *et al.* han informado del suministro satisfactorio con vector adenovírico *in vivo* de un gen por inyección intraarticular, y expresión prolongada del gen en el sinovio por pretratamiento de la articulación con anticuerpo monoclonal antirreceptor de células T (Sawchuk *et al.*, 1996, *ibid.*). Finalmente, se aprecia que la transferencia génica *ex vivo* de antagonista del receptor de interleuquina-1 humano usando un retrovirus ha producido expresión intraarticular de alto nivel y eficacia terapéutica en el tratamiento de la artritis, y ahora está entrando en ensayos de terapia génica humana aprobados por la FDA (Evans y Robbins, 1996, Curr. Opin. Rheumatol. 8:230-234). Por lo tanto, el estado de la técnica en terapia génica ha conducido a la FDA a considerar la terapia génica humana una estrategia apropiada para el tratamiento de al menos la artritis. Tomados en conjunto, todos los estudios anteriores en terapia génica indican que el suministro y expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la presente invención es factible.

Otro método de suministro de moléculas recombinantes es en un vehículo no de direccionamiento (por ejemplo, como moléculas de ADN "desnudo", tal como se muestra, por ejemplo, en Wolff *et al.*, 1990, Science 247, 1465-1468). Dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes se inyectan típicamente por administración directa o intramuscular. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes a administrarse por administración de ADN desnudo incluyen una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención, y preferiblemente incluye una molécula recombinante de la presente invención que preferiblemente es competente en la replicación, o amplificación de otro modo. Un reactivo de ácido nucleico desnudo de la presente invención puede comprender una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyendo una molécula recombinante bicistrónica. El suministro de ácido nucleico desnudo puede incluir las vías de administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intranasal y oral, siendo la más preferida la inyección directa en el tejido diana. Una dosis única preferida de una vacuna de ácido nucleico desnudo varía de aproximadamente 1 nanogramo (ng) a aproximadamente 100 µg, dependiendo de la vía de administración y/o método de suministro, como puede determinarse por los expertos en la materia. Los métodos adecuados de suministro incluyen, por ejemplo, por inyección, como gotas, en forma de aerosol y/o tópica. En una realización, las construcciones de ADN puro cubren la superficie de partículas de oro (1 a 3 µm de diámetro) y se impulsan en células cutáneas o músculo con una "pistola génica".

En el método de la presente invención, las composiciones terapéuticas pueden administrarse a cualquier miembro de la clase vertebrados, Mammalia, incluyendo aunque sin limitación, primates, roedores, ganado bovino y mascotas domésticas. Los pacientes preferidos a proteger son los seres humanos. De acuerdo con la presente invención, un tamaño de dosis individual adecuado de un compuesto o composición es una dosis que escapa de regular la actividad biológica deseada, cuando se administra una o más veces sobre un período de tiempo adecuado. Las dosis pueden variar dependiendo del objetivo de la administración o la afección o la enfermedad que se está tratando. Preferiblemente, una proteína o anticuerpo de la presente invención se administra en una cantidad que es entre aproximadamente 50 U/kg y aproximadamente 15.000 U/kg de peso corporal del paciente. En otra realización, se administra una proteína o anticuerpo en una cantidad que es entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal del paciente, y más preferiblemente, entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal del paciente. Cuando el compuesto a suministrar es una molécula de ácido nucleico, una dosis individual apropiada produce al menos aproximadamente 1 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico suministrado. Más preferiblemente, una dosis individual apropiada es una dosis que produce al menos aproximadamente 10 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico suministrado; e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 50 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico suministrado; y mucho más preferiblemente, al menos aproximadamente 100 pg de proteína expresada por mg de proteína de tejido total por µg de ácido nucleico suministrado. Una dosis individual preferida de una vacuna de ácido nucleico desnudo varía de aproximadamente 1 nanogramo (ng) a aproximadamente 100 µg, dependiendo de la vía de administración y/o método de suministro, como puede determinarse por los expertos en la materia. Los métodos adecuados de

suministro incluyen, por ejemplo, por inyección, como gotas, en forma de aerosol y/o tópica. En una realización, las construcciones de ADN puro cubren la superficie de partículas de oro (1 a 3 μm de diámetro) y se impulsan en células cutáneas o músculo con una "pistola génica". Será obvio para un experto en la materia que la cantidad de dosis administrada a un paciente depende del objetivo de la administración (por ejemplo, el grado de la enfermedad o afección a tratarse y la respuesta de un paciente individual al tratamiento).

Como se usa en este documento, la expresión "protegido de una enfermedad" se refiere a reducir los síntomas de la enfermedad; reducir la aparición de la enfermedad, y/o reducir la gravedad de la enfermedad. Proteger a un paciente puede referirse a la capacidad de una composición de la presente invención, cuando se administra a un paciente, de prevenir la aparición de una enfermedad y/o curar o aliviar los síntomas, signos o causas de la enfermedad. Por tanto, proteger a un paciente de una enfermedad incluye tanto prevenir la aparición de la enfermedad (tratamiento profiláctico) como tratar a un paciente que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico) para reducir los síntomas de la enfermedad. En particular, proteger a un paciente de una enfermedad o potenciar otra terapia (por ejemplo, trasplante) se consigue regulando una actividad dada de modo que se obtenga un efecto beneficioso. Un efecto beneficioso puede evaluarse fácilmente por un experto en la materia y/o por un clínico cualificado que está tratando al paciente. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un mamífero e incluye un estado en que están presentes síntomas de enfermedad, así como afecciones en que ha sucedido una desviación (por ejemplo, infección, mutación génica, defecto genético, etc.), pero aún no se han manifestado síntomas.

Más específicamente, una composición de la presente descripción que comprende un homólogo de CystC, u otro compuesto relacionado, cuando se administra a un animal por el método de la presente invención, preferiblemente produce un resultado que puede incluir el alivio de la enfermedad (por ejemplo, reducción de al menos un síntoma o manifestación clínica de la enfermedad), eliminación de la enfermedad, reducción de un tumor o lesión asociado con la enfermedad, eliminación de un tumor o lesión asociado con la enfermedad, prevención o alivio de una enfermedad secundaria resultante de la aparición de una enfermedad primaria (por ejemplo, cáncer metastásico resultante de un cáncer primario), prevención de la enfermedad, y estimulación de inmunidad de células efectoras contra la enfermedad. Las composiciones de la presente invención son eficaces para regular la actividad de TGF- β y/o cathepsina B y de ese modo regular los efectos, corriente abajo de dichas actividades, y más particularmente, para mejorar la respuesta terapéutica a neoplasias humanas, así como una diversidad de enfermedades proliferativas y fibróticas reguladas por TGF- β .

Los cánceres a tratarse o prevenirse usando los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejido blando, sarcomas de hueso, cánceres testiculares, cánceres prostáticos, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres cerebrales, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, cánceres hepáticos primarios, cánceres pulmonares, cánceres pancreáticos, cánceres gastrointestinales, carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas, y cánceres metastásicos de los mismos. Una composición terapéutica de la presente invención es útil para inhibir la neoplasia tumoral inhibiendo (i) la invasión mediada por cathepsina B, (ii) la activación de TGF- β mediada por cathepsina B, y/o (iii) la transducción de señales de TGF- β . Preferiblemente, el uso de homólogos de CystC de acuerdo con la presente invención en un animal que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer produce un resultado seleccionado del grupo de alivio del cáncer, prevención de cáncer metastásico, o prevención del cáncer primario. En una realización, el uso de CystC y compuestos relacionados es particularmente deseable para el tratamiento de cáncer metastásico o cáncer que es cáncer en fase tardía.

Las afecciones o enfermedades proliferativas o fibróticas mediadas al menos en parte por la expresión o actividad de TGF- β que pueden tratarse o prevenirse usando los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, fibrosis (renal, hepática, pulmonar, etc.), curación o cicatrización excesiva de heridas, hipertensión, y rechazo de trasplante de órganos (es decir, se han asociado altos niveles de TGF- β con rechazo).

Ciertas enfermedades y afecciones se han asociado con niveles aumentados de CystC y dichas enfermedades y afecciones también pueden tratarse regulando la actividad de CystC como se describe en este documento. Dichas enfermedades incluyen, aunque sin limitación, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide y afecciones asociadas con dolor persistente.

La presente descripción también se refiere a un método para identificar un compuesto regulador que regule la actividad de TGF- β , adecuadamente, que es un antagonista de TGF- β . Más preferiblemente, el compuesto tiene la capacidad de inhibir la estimulación por TGF- β de eventos metastásicos de inicio, incluyendo polarización celular disminuida, contacto célula-célula reducido, y elevada invasión y migración celular. El compuesto también puede tener la capacidad de regular la actividad de cathepsina B (por ejemplo, un homólogo de CystC), pero dicha actividad no es necesaria del compuesto de la presente invención.

También se describe un método que incluye las etapas de: (a) diseñar o identificar un compuesto antagonista putativo basado en la estructura de Cistatina C (por ejemplo, la estructura primaria o terciaria); (b) sintetizar el compuesto; y (c) seleccionar compuestos de (b) que inhiban la actividad biológica de TGF- β . La Cistatina C puede

incluir Cistatina C de cualquier especie animal, pero es preferiblemente Cistatina C humana. En esta realización, la estructura de Cistatina C puede incluir la estructura lineal o primaria, así como la estructura terciaria. La Cistatina C humana se ha cristalizado y se ha determinado la estructura, y se encuentran las coordenadas atómicas para la estructura terciaria de Cistatina C en el n.º de acceso a la base de proteínas 1G96 (descrito en y depositado por Janowski *et al.*, Nat. Struct. Biol. 8(4):316-320, 2001), incorporado en este documento por referencia en su totalidad. Las siguientes publicaciones, también describen la estructura de CystC o cistatina: Ekiel *et al.*, J. Mol. Biol. 271(2):266-277, 1997; Bode *et al.*, EMBO J. 7(8):2593-2599, 1988; y Kozak *et al.*, Acta Crystallog. D Biol. Crystallog. 55(11):1939-1942, 1999. La secuencia primaria o lineal de CystC de diversas especies animales se ha divulgado y descrito anteriormente, incluyendo diversa información respecto a la relación de la estructura a la función de la secuencia lineal.

Teniendo las coordenadas atómicas que definen la estructura terciaria de la proteína CystC, se puede producir una representación o modelo de la estructura tridimensional de una proteína CystC, tal como un modelo informático. Un modelo informático de la presente invención puede producirse usando cualquier programa de software adecuado incluyendo, aunque sin limitación, MOLSCRIPT 2.0 (Avatar Software AB, Heleneborgsgatan 21C, SE-11731 Estocolmo, Suecia), el programa de representación gráfica O (Jones *et al.*, Acta Crystallography, vol. A47, pág. 110, 1991), el programa de representación gráfica GRASP, o el programa de representación gráfica INSIGHT. El hardware informático adecuado útil para producir una imagen de la presente invención es conocido para los expertos en la materia (por ejemplo, una estación de trabajo Silicon Graphics).

Como se usa en este documento, el término "modelo" se refiere a una representación en un medio tangible de la estructura tridimensional de una proteína, polipéptido o péptido. Por ejemplo, un modelo puede ser una representación de la estructura tridimensional en un archivo electrónico, en una pantalla de ordenador, o un trozo de papel (es decir, en un medio bidimensional), y/o en forma de una figura de bolas y varillas. Los modelos tridimensionales físicos son tangibles e incluyen, aunque sin limitación, modelos de varillas y modelos de relleno de espacio. Puede hacerse una imagen de un modelo, por ejemplo, en una pantalla de ordenador expresando (o representando) y manipulando el modelo en una pantalla de ordenador usando un hardware informático y tecnología de software apropiados conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, Evans y Sutherland, Salt Lake City, Utah, y Biosym Technologies, San Diego, CA). Las imágenes y dibujos en pantalla de ordenador del modelo pueden visualizarse en varios formatos incluyendo representaciones de relleno de espacio, trazos de carbono α , diagramas de cintas y mapas de densidad de electrones.

Una representación o modelo de la estructura tridimensional de una proteína CystC también puede determinarse usando técnicas que incluyen remplazo molecular o SIR/MIR (remplazo isomorfo simple/múltiple). Los métodos de remplazo molecular son conocidos en líneas generales, por los expertos en la materia (descritos en líneas generales en Brunger, Meth. Enzym., vol. 276, pág. 558-580, 1997; Navaza y Saludjian, Meth. Enzym., vol. 276, pág. 581-594, 1997; Tong y Rossmann, Meth. Enzym., vol. 276, pág. 594-611, 1997; y Bentley, Meth. Enzym., vol. 276, pág. 611-619, 1997) y se realizan en un programa de software que incluye, por ejemplo, AmoRe (CCP4, Acta Cryst. D50, 760-763 (1994)) o XPLOR. En resumen, se recogen datos de difracción de rayos-X del cristal de una estructura diana cristalizada. Los datos de difracción de rayos-X se transforman para calcular una función de Patterson. La función de Patterson de la estructura diana cristalizada se compara con una fracción de Patterson calculada a partir de una estructura conocida (mencionada en este documento como estructura de búsqueda). La función de Patterson de la estructura diana cristalizada se rota sobre la función de Patterson de estructura de búsqueda para determinar la orientación correcta de la estructura diana cristalizada en el cristal. Después se calcula la función de traslado para determinar la localización de la estructura diana con respecto a los ejes del cristal. Una vez se ha posicionado correctamente la estructura diana cristalizada en la celda unitaria, pueden calcularse fases iniciales para los datos experimentales. Estas fases son necesarias para el cálculo de un mapa de densidad de electrones a partir del cual pueden observarse diferencias estructurales y para el refinamiento de la estructura. Preferiblemente, las características estructurales (por ejemplo, secuencia de aminoácidos, enlaces disulfuro conservados, y hebras β o láminas β) de la molécula de búsqueda están relacionadas con la estructura diana cristalizada.

El modelo de la estructura terciaria de la proteína CystC después puede usarse para diseñar o identificar compuestos candidatos que sean antagonistas de TGF- β , por ejemplo, de los que se predice que tienen otra actividad biológica CystC (por ejemplo, actividad inhibidora de cisteína proteasa). Dichos compuestos pueden diseñarse usando diseño de fármacos basado en estructura, que se refiere a la predicción de una conformación de un péptido, polipéptido, proteína, o interacción conformacional entre un péptido o polipéptido, y un compuesto, usando la estructura tridimensional del péptido, polipéptido o proteína. Típicamente, el diseño de fármacos basado en estructuras se realiza con un ordenador. Por ejemplo, en líneas generales, para que una proteína interactúe de forma eficaz con (por ejemplo, se una a) un compuesto, es necesario que la estructura tridimensional del compuesto asuma una conformación compatible que permita que el compuesto se una a la proteína de tal modo que se obtenga un resultado deseado tras la unión. El conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína posibilita que un experto en la materia diseñe un compuesto que tenga dicha conformación compatible, o seleccione dicho compuesto a partir de bibliotecas disponibles de compuestos.

La etapa de diseño de compuestos puede incluir crear un nuevo compuesto químico o buscar bases de datos de bibliotecas de compuestos conocidos (por ejemplo, un compuesto enumerado en una base de datos de exploración

en ordenador que contenga estructuras tridimensionales de compuestos conocidos). El diseño también puede realizarse simulando compuestos químicos que tengan restos sustitutos en ciertos elementos estructurales. La etapa de diseño puede incluir seleccionar un compuesto químico en base a una función conocida del compuesto. Una etapa preferida de diseño comprende exploración por ordenador de una o más bases de datos de compuestos en que la estructura tridimensional del compuesto es conocida y se hace interaccionar (por ejemplo, se ensambla, alinea, acopla, interconecta) con la estructura tridimensional de un receptor de TGF- β , por ejemplo, por ordenador (por ejemplo, como se describe por Humblet y Dunbar, *Animal Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 28, pág. 275-283, 1993, M Venuti, ed., Academic Press). Los métodos para sintetizar compuestos químicos adecuados son conocidos para los expertos en la materia y dependen de la estructura del agente químico que se está sintetizando. Los métodos para evaluar la bioactividad del compuesto sintetizado dependen de la bioactividad del compuesto (por ejemplo, inhibidora o estimuladora) que se describe en este documento.

El diseño de fármacos basado en estructura comprende identificar un compuesto químico que complemente la forma de una proteína CystC o una parte de la misma (por ejemplo, la parte que interacciona con receptores de TGF- β). Dicho método se menciona en este documento como "enfoque geométrico". En un enfoque geométrico, se reduce la cantidad de grados internos de libertad (y los correspondientes mínimos locales en el espacio de conformación molecular) considerando solamente las interacciones geométricas (esfera dura) de dos cuerpos rígidos, donde un cuerpo (el sitio activo) contiene "bolsillos" o "surcos" que forman sitios de unión para el segundo cuerpo (la molécula de complementación, tal como un ligando).

El enfoque geométrico se describe por Kuntz *et al.*, *J. Mol. Biol.*, vol. 161, pág. 269, 1982, que se incorpora por esta referencia en este documento en su totalidad. El algoritmo para el diseño de compuestos químicos puede implementarse usando el programa de software DOCK Package, Versión 1.0 (disponible en la Regents of the University of California). Según el algoritmo de Kuntz, la forma de la cavidad o surco en la superficie de una estructura en un sitio de unión o interfaz se define como una serie de esferas solapantes de diferentes radios. Entonces se hace una búsqueda en una o más bases de datos existentes de datos cristalográficos (por ejemplo, el Cambridge Structural Database System mantenido por el University Chemical Laboratory, Cambridge University, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, R.U.) o el Protein Data Bank mantenido por Brookhaven National Laboratory, para compuestos químicos que se aproximen a la forma así definida. Los compuestos químicos identificados por el enfoque geométrico pueden modificarse para satisfacer los criterios asociados con complementariedad química, tales como enlace de hidrógenos, interacciones iónicas o interacciones de Van der Waals.

Un compuesto que se identifica por el método puede originarse a partir de un compuesto que tiene complementariedad química y/o estereoquímica con CystC o una parte de la misma. Dicha complementariedad es característica de un compuesto que coincide con la estructura de la proteína en forma o en distribución de grupos químicos y se une al receptor de TGF- β (por ejemplo, T β R-II) para inhibir la unión de TGF- β y/o inhibir la transducción de señales celulares en una célula que expresa el receptor de TGF- β . Un compuesto que se une a un sitio de unión de ligando del receptor de TGF- β puede asociarse con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-6} M, con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M, o con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-8} M. Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Diversos sustituyentes en los compuestos de la presente invención pueden estar presentes en los compuestos de partida, añadirse a uno cualquiera de los intermedios o añadirse después de la formación de los productos finales por métodos conocidos de reacciones de sustitución o conversión. Si los propios sustituyentes son reactivos, entonces los sustituyentes pueden protegerse en sí mismos de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica. Se conoce una diversidad de grupos protectores en la técnica, y pueden emplearse. Ejemplos de muchos de los posibles grupos pueden encontrarse en: "Protective Groups in Organic Synthesis" de T. W. Green, John Wiley and Sons, 1981, que se incorpora en este documento en su totalidad. Por ejemplo, pueden añadirse grupos nitro por nitración y el grupo nitro puede convertirse en otros grupos, tal como amino por reducción, y alogenación por diazotización del grupo amino y remplazo de grupo diazo con halógeno. Pueden añadirse grupos acilo por acilación de Friedel-Crafts. Los grupos acilo después pueden transformarse en los correspondientes grupos alquilo por diversos métodos, incluyendo la reducción de Wolff-Kishner y la reducción de Clemmenson. Los grupos amino pueden alquilarse para formar grupos mono y dialquilamino; y pueden alquilarse grupos mercapto e hidroxilo para formar correspondientes éteres. Los alcoholes primarios pueden oxidarse mediante agentes de oxidación conocidos en la técnica para formar ácidos carboxílicos o aldehídos, y los alcoholes secundarios pueden oxidarse para formar cetonas. Por tanto, pueden emplearse reacciones de sustitución o alteración para proporcionar una diversidad de sustituyentes en toda la molécula del material de partida, intermedios, o el producto final, incluyendo producto aislado. Como los compuestos de la presente invención pueden tener ciertos sustituyentes que están necesariamente presente, la introducción de cada sustituyente depende, por supuesto, de los sustituyentes específicos implicados y la química necesaria para su formación. Por tanto, la consideración del modo en que un sustituyente se vería afectado por una reacción química cuando se forma un segundo sustituyente implicaría técnicas familiares para los expertos en la materia. Esto dependería adicionalmente del anillo implicado.

Debe entenderse que el alcance de esta invención abarca no solamente los diversos isómeros que pueden existir sino también las diversas mezclas de isómeros que pueden formarse.

Si el compuesto de la presente invención contiene uno o más centro quirales, el compuesto puede sintetizarse de forma enantioselectiva o puede prepararse o separarse una mezcla de enantiómeros y/o diastereómeros. La resolución de los compuestos de la presente invención, sus materiales de partida y/o los intermedios puede realizarse por procedimientos conocidos, por ejemplo, como se describe en el compendio de cuatro volúmenes Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds: Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N.Y. y en Enantiomers, Racemates and Resolutions, Jean Jacques, Andre Collet y Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1981, que se incorporan en este documento en su totalidad. Básicamente, la resolución de los compuestos se basa en las diferencias en las propiedades físicas de diastereómeros por unión, ya sea química o enzimáticamente, de un resto enantioméricamente puro que produce formas que son separables por cristalización fraccionada, destilación o cromatografía.

Cuando los compuestos de la presente invención contienen un resto de olefina y dicho resto de olefina puede estar en configuración *cis* o *trans*, los compuestos pueden sintetizarse para producir *cis*-o *trans*-olefina, selectivamente, como productos predominantes. Como alternativa, el compuesto que contiene un resto de olefina puede producirse como una mezcla de *cis*- y *trans*-olefinas, y separarse usando procedimientos conocidos, por ejemplo, por cromatografía como se describe en W. K. Chan, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1974, 96, 3642.

En la etapa final del método, los compuestos identificados por el diseño basado en estructura o identificación pueden evaluarse para la bioactividad, y particularmente, la capacidad de regular la actividad de TGF- β , y mucho más particularmente, para antagonizar la actividad de TGF- β , usando cualquiera de los métodos descritos en este documento (anteriormente y a continuación) e incluyen adicionalmente cualquier método conocido en la técnica de evaluación de la actividad de TGF- β . Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, la detección de la capacidad del compuesto de unirse al receptor de TGF- β , y particularmente a T β R-II, o la detección de la capacidad del compuesto de inhibir la expresión génica sensible a TGF- β , o la capacidad del compuesto de inhibir la malignidad e invasión de células tumorales mediadas por TGF- β .

El método de identificación de compuestos puede incluir las etapas de: (a) identificación de proteínas que son homólogos estructurales de Cistatina C; y (b) evaluación de proteínas de (a) que son capaces de regular la actividad biológica de TGF- β . Por ejemplo, puede evaluarse la capacidad de la proteína de (a) de unirse a un receptor de TGF- β , tal como T β R-II. Los métodos de producción e identificación de compuestos que son homólogos estructurales de CystC usando diseño informático y el enfoque geométrico, por ejemplo, se han descrito en detalle anteriormente. Dada la información estructural proporcionada en este documento y especialmente la información de estructura a función que correlaciona CystC con sus actividades biológicas, un experto en la materia también será capaz de producir homólogos proteicos más simples, incluyendo fragmentos, de CystC para su uso en estos métodos. Los métodos para producir homólogos proteicos de CystC se han descrito en detalle anteriormente, y pueden identificarse simplemente y diseñarse por análisis de secuencia y selección de modificaciones apropiadas que puedan introducirse usando técnicas moleculares convencionales (por ejemplo, producción recombinante de un homólogo o fragmento).

El método puede incluir las etapas de: (a) poner en contacto una célula que expresa un receptor de TGF- β y Cistatina C con un compuesto regulador putativo; (b) detectar la expresión de Cistatina C en la célula; y (c) comparar la expresión de Cistatina C después del contacto con el compuesto con la expresión de Cistatina C antes del contacto con el compuesto, donde la detección de un cambio en la expresión de Cistatina C en las células después del contacto con el compuesto en comparación con antes del contacto con el compuesto indica que el compuesto es un regulador putativo de TGF- β y la transducción de señales de TGF- β . Como alternativa, puede ponerse en contacto una célula que expresa un receptor de TGF- β con TGF- β y un homólogo putativo o mimético de CystC y determinar si el homólogo putativo o mimético de CystC regula la activación del receptor de TGF- β por TGF- β . Pueden usarse otras variaciones y combinaciones de TGF- β , sus receptores, CystC y homólogos de la misma en ensayos similares para determinar la capacidad de compuestos reguladores candidatos de regular la actividad de TGF- β de un modo adecuado con la regulación de la actividad de TGF- β por CystC de tipo silvestre. Los compuestos reguladores putativos pueden añadirse al sistema de ensayo antes de, simultáneamente con, o después de la adición o provisión de otros compuestos en el ensayo (por ejemplo, células, TGF- β , CystC, etc.). Los ensayos descritos anteriormente también pueden realizarse usando ensayos no basados en células, donde se evalúa la capacidad de un compuesto regulador de imitar la actividad biológica de CystC de tipo silvestre y/o de regular específicamente las actividades mediadas por TGF- β de un modo específico de CystC (por ejemplo, por contacto de TGF- β y/o su receptor, o CystC y un receptor de TGF- β , con un compuesto regulador putativo y evaluación de la unión u otra actividad).

Como se usa en este documento, el término "putativo" o "candidato" se refiere a compuestos que tienen una actividad reguladora desconocida, al menos con respecto a la capacidad de dichos compuestos de regular la expresión de un gen o proteína o la actividad biológica de una proteína como se describe en este documento. En el método de identificación de un compuesto regulador de acuerdo con la presente invención, el método puede ser un ensayo basado en células, o un ensayo no basado en células. De acuerdo con la presente invención, se realiza un ensayo basado en células en condiciones que son eficaces para detectar compuestos reguladores útiles en el método de la presente invención. Las condiciones eficaces incluyen, aunque sin limitación, medios apropiados, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permitan el crecimiento de las células,

Las condiciones en las cuales se pone en contacto una proteína de acuerdo con la presente invención con un compuesto regulador putativo, tal como por mezcla, pueden ser condiciones en que la proteína no se estimula (activa) si no hay esencialmente nada de compuesto regulador presente.

- 5 Como alternativa, las condiciones en las que una proteína de acuerdo con la presente invención se pone en contacto con un compuesto regulador putativo, tal como por mezcla, pueden ser condiciones en que la proteína normalmente se estimula (activa) si no hay esencialmente nada de compuesto regulador presente.

10 Los presentes métodos implican poner en contacto células con el compuesto que se está ensayando durante un tiempo suficiente para permitir la interacción, activación o inhibición de la proteína por el compuesto. El período de contacto con el compuesto que se está ensayando puede variarse dependiendo del resultado que se está midiendo, y puede determinarse por un experto en la materia. Por ejemplo, para ensayos de unión, típicamente es adecuado un tiempo más corto de contacto con el compuesto que se está ensayando, que cuando se evalúa la activación. Como se usa en este documento, la expresión "período de contacto" se refiere al período de tiempo durante el cual las células están en contacto con el compuesto que se está ensayando. La expresión "período de incubación" se refiere al tiempo completo durante el cual se permite que las células crezcan antes de la evaluación, y puede incluir el período de contacto. Por tanto, el período de incubación incluye todo el período de contacto y puede incluir un período de tiempo adicional durante el cual el compuesto que se está ensayando no está presente, pero durante el cual está continuando el crecimiento (en el caso de un ensayo basado en células) antes de la valoración.

20 El ensayo de la presente invención también puede ser un ensayo no basado en células. En esta realización, el compuesto regulador putativo puede ponerse en contacto directamente con una proteína aislada, o un componente proteico (por ejemplo, una parte extracelular aislada de un receptor, o receptor soluble), y puede evaluarse la capacidad del compuesto regulador putativo de unirse a la proteína o componente proteico, tal como por un inmunoensayo u otro ensayo de unión. El ensayo puede entonces incluir la etapa de análisis adicional de si los compuestos reguladores putativos que se unen a una parte de la proteína son capaces de aumentar o disminuir la actividad de la proteína. Dichas etapas adicionales pueden realizarse por ensayos basados en células, como se ha descrito anteriormente, o por ensayos no basados en células.

30 Los métodos para evaluar cualquier compuesto identificado por cualquiera de los métodos descritos anteriormente para su uso en cualquiera de los métodos de la invención se han analizado en detalle en otra parte en este documento. Los agonistas y antagonistas identificados por los métodos anteriores o cualquier otro método adecuados son útiles en una diversidad de métodos terapéuticos como se describe en este documento.

35 Se proporcionan los siguientes resultados experimentales con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

40 Se usaron los siguientes materiales y métodos en los siguientes Ejemplos 1-7.

Plásmidos de Cistatina C humana

45 Se sintetizó un vector retroviral de CystC por amplificación por PCR del ADNc de CystC humana de longitud completa a partir de EST 4183311. El producto de PCR resultante se lanzó a través del vector pcDNA3.1/Myc-His B (Invitrogen) en sitios de restricción Eco RI (extremo N-terminal) y Xho I (extremo C-terminal) para marcar de forma terminal CystC humana con marcas Myc e (His)6. Después de ello, se amplificó por PCR el ADNc de CystC marcado resultante usando oligonucleótidos que contenían sitios de restricción Eco RI (extremo N-terminal) y Xho I (extremo C-terminal), y posteriormente se ligó en sitios idénticos inmediatamente cadena arriba del IRES en el vector retroviral bicistónico, pMSCV-IRES-GFP (42).

50 La síntesis de un vector retroviral de $\Delta 14$ CystC procedió por amplificación por PCR del inserto de ADNc de $\Delta 14$ CystC contenido en pGEX-4T1 (véase a continuación), que se lanzó a través del vector pSecTag B (Invitrogen) en los sitios de restricción Nco I (extremo N-terminal) y BglII (extremo C-terminal). Esta etapa de clonación marcó de forma C-terminal el ADNc de $\Delta 14$ CystC con las marcas Myc e (His)6, y también añadió la secuencia líder de Ig a su extremo N-terminal para permitir su secreción cuando se expresan células de mamífero. El $\Delta 14$ CystC marcado resultante se amplificó por PCR usando oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción Hpa I (extremo N-terminal) y Eco RI (extremo C-terminal) que facilitó el ligamiento del fragmento de PCR en pMSCV-IRES-GFP. Cuando se expresan células de mamífero, la proteína $\Delta 14$ CystC era ligeramente más grande que la de su correspondiente CystC de tipo silvestre debido a aminoácidos N-terminales adicionales añadidos a $\Delta 14$ CystC por el vector pSecTag.

60 Todos los insertos de ADNc de CystC y $\Delta 14$ CystC se secuenciaron en su totalidad en una máquina de secuenciación de ADN Applied Biosystems 377A.

65

Construcción y purificación de proteína de fusión

Se sintetizó una proteína de fusión de CystC por amplificación por PCR del ADNc del CystC humana de longitud completa (menos su secuencia señal) usando oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción Eco RI (extremo N-terminal) y Xho I (extremo C-terminal). El fragmento de PCR resultante se subclonó en el extremo C-terminal de glutatión S-transferasa codificado por el vector de expresión bacteriana, pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech). Se realizó mutagénesis dirigida al sitio de GST-CystC para deletar su motivo conservado inhibidor de cisteína proteinasa ($\Delta 14$ CystC; restos 80-93) usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Todos los insertos de ADNc de fusión se secuenciaron en su totalidad en una máquina de secuenciación de ADN Applied Biosystems 377A.

La expresión y purificación de diversas proteínas de fusión de GST a partir de *E. coli* transformada fue como se ha descrito previamente (43).

Plásmido de T β R-II soluble

Se sintetizó un receptor de TGF- β tipo II humano soluble (T β R-II) por amplificación de PCR del dominio extracelular de T β R-II (sT β R-II; nucleótidos 72-516) usando oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción Kpn I (extremo N-terminal) y Not I (extremo C-terminal). El producto de PCR resultante se ligó en los correspondientes sitios en el vector pSecTag B, que marcó de forma C-terminal el ADNc de sT β R-II con marcas Myc e (His)₆ y añadió la secuencia líder de Ig en su extremo N-terminal. El sT β R-II resultante se secuenció en su totalidad en una máquina de secuenciación de ADN Applied Biosystems 377A.

Aislamiento e identificación de CystC murina

Se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 murinos en placas de 15 cm en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % hasta obtener una confluencia del 90 %. Las células después se volvieron quiescentes por lavado extensivo en PBS, seguido por incubación en DMEM sin suero durante 12 h a 37 °C. Las células 3T3-L1 quiescentes se marcaron metabólicamente con [35S] metionina en ausencia o presencia de TGF- β 1 (10 ng/ml) durante 12 h a 37 °C. Después de ello, se recogieron los medios virgen y condicionado con TGF- β (10 placas/condición), se aclararon por centrifugación, y se concentraron inicialmente hasta ~3 ml en un concentrador Amicon (MWC de 1000 Da) y finalmente mediante precipitación con ácido tricloroacético/desoxicolato. Los sedimentos proteicos resultantes se resuspendieron, neutralizaron, y precipitaron con acetona antes de su resuspensión en tampón de enfoque isoelectrico (urea 8 M, CHAPS al 4 %, DTT 10 mM, y 3-10 anfólitos al 0,2 %). Se aplicaron muestras de proteína a tiras de enfoque isoelectrico de pH 3-10 de 11 cm y se revelaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (3 tiras/condición; Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas sometidas a enfoque y su eléctrico después se fraccionaron a través de SDS-PAGE al 10 %, y posteriormente se transfirieron de forma electroforética a Immobilon-P (Millipore). Las proteínas secretadas se visualizaron por tinción por Coomassie y autorradiografía de las membranas secadas. Se escindió una proteína de ~18 kDa expresada de forma diferencial que era evidente en medios condicionados con TGF- β de las membranas y se secuenció usando el kit de secuenciación Sequelon-AA (ABI).

Transferencia de Northern

Se incubaron células 3T3-L1 quiescentes en ausencia o presencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 0-48 h, y posteriormente se recogieron en reactivo RNazol (Tel-Test) para aislar el ARN total. Después se sometieron a electroforesis diez μ g de ARN total a través de geles de agarosa/formaldehído al 1,2 % y se transfirieron a membrana de nylon. El ARN inmovilizado se sondeó con una sonda de ADNc de CystC humana marcada con 32P durante una h a 68 °C en ExpressHyb (Clontech). Después de ello, la membrana se lavó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se visualizó el ARNm de Cistatina C por autorradiografía.

Serie de tumor

Se examinaron los efectos de la tumorigénesis sobre la expresión de CystC por hibridación de una sonda de ADNc de CystC humana de longitud completa radiomarcada con 32P a una serie de ADNc normal/de tumor humana coincidente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Clontech). Se visualizó expresión de CystC en tejidos humanos normales y malignos por autorradiografía. Se desmontó la serie de ADNc y se volvió a sondear con una sonda de ADNc de ubiquitina marcada con 32P proporcionada por el fabricante. La expresión de CystC se normalizó a la de ubiquitina, y se determinó la relación de expresión de CystC entre pares individuales de tejido normal y tumoral. Una relación de ≥ 2 o $\leq 0,5$ se consideró significativa.

Infecciones retrovíricas

Se produjeron sobrenadantes retrovíricos de control (es decir, pMSCV-IRES-GFP), CystC o $\Delta 14$ CystC por células de empaquetamiento retrovítico EcoPac2 (Clontech) y se usaron para infectar fibroblastos 3T3-L1 murinos y células de fibrosarcoma HY1080 humanas como se ha descrito previamente (42). Cuarenta y ocho horas después de la

infección, se recogieron el 10 % superior de las células que expresaban GFP en un clasificador celular MoFlo (Cytomation), y posteriormente se expandieron para producir poblaciones estables de células que expresaban control, CystC, o $\Delta 14$ CystC que tenían niveles equivalentes de GFP a una tasa de positividad de >90 %.

5 *Transferencia de Western*

Se recogieron medios condicionados (2 ml) de células 3T3-L1 que expresaban de forma estable GFP, CystC o $\Delta 14$ CystC, se aclararon por centrifugación, y se centrifugaron por precipitación con ácido tricloroacético/desoxicolato. Las proteínas se fraccionaron a través de un gel de SDS-PAGE al 12 % y posteriormente se transfirieron de forma electroforética a nitrocelulosa. La membrana se sondeó con anticuerpos policlonales anti-CystC (1:1000, Upstate Biotechnology), y los inmunocomplejos resultantes se visualizaron por quimioluminiscencia potenciada.

Ensayos de invasión

Se determinó el efecto de CystC y $\Delta 14$ CystC sobre la invasión de células HT1080 y 3T3-L1 como se ha descrito previamente (42). En resumen, se recubrieron las cámaras superiores con 100 μ l de Matrigel diluido (1:50 en medio sin suero), que se dejó que se evaporara hasta sequedad durante una noche a temperatura ambiente. La siguiente mañana se rehidrataron las mezclas de Matrigel y posteriormente se cultivaron con células HT1080 o 3T3-L1 que expresaban control, CystC, o $\Delta 14$ CystC a una densidad de 100.000 células/cámara. Se estimuló la invasión celular por adición de suero al 2 % a las cámaras inferiores. Cuarenta y ocho horas después, las células se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo y se fijaron inmediatamente durante 15 min con etanol al 95 %. Las células que quedaban en las cámaras superiores se retiraron con un hisopo de algodón, mientras que aquellas que quedaban en la cámara inferior se tiñeron con violeta cristal. La cuantificación de células invasoras se determinó a través de dos medidas independientes, que produjeron resultados idénticos: (i) recuento manual en microscopio óptico, y (ii) extracción de colorante violeta cristal por incubación de las membranas en ácido acético al 10 %, seguido por espectrofotometría a 590 nm.

En algunos experimentos, se examinaron los efectos de CystC recombinante y $\Delta 14$ CystC sobre la invasión de células 3T3-L1. Para hacer eso, se permitió que las células 3T3-L1 (100.000 células/cámara) invadieran a través de Matrigel en ausencia o presencia de 10 mg/ml de GST recombinante, GST-CystC, o $\Delta 14$ CystC, junto con o sin 5 ng/ml de TGF- β 1. Todos los procedimientos posteriores se realizaron como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de gen indicador de luciferasa

Se realizó análisis de la actividad luciferasa dirigida por el indicador p3TP sintético ((26); proporcionado generosamente por la Dra. Joan Massague, Sloan Kettering) como se ha descrito previamente (42). En resumen, se cultivaron células 3T3-L1 o HT1080 que expresaban control, CystC o $\Delta 14$ CystC en placas de 24 pocillos a una densidad de 45.000 células/pocillo y se dejó que se adhirieran durante una noche. Las células se transfectaron de forma transitoria la siguiente mañana por exposición durante una noche a liposomas LT1 (Mirus) que contenían 300 ng/pocillo de p3TP luciferasa y 100 ng/pocillo de pCMV- β -gal. Después de ello las células se lavaron dos veces con PBS y se estimularon durante una noche en medio sin suero con concentraciones crecientes de TGF- β 1 como se indica. La siguiente mañana, se determinaron las actividades luciferasa y β -gal contenidas en extracto celulares solubilizados con detergente.

En algunos experimentos, se determinaron los efectos de CystC recombinante y $\Delta 14$ CystC sobre la actividad p3TP luciferasa de células 3T3-L1. Para hacer eso, se transfectaron de forma transitoria células 3T3-L1 como anteriormente, y posteriormente se estimularon con TGF- β 1 (5 ng/ml) en ausencia o presencia de 10 mg/ml de GST recombinante, GST-CystC, o $\Delta 14$ CystC. Todos los procedimientos posteriores se realizaron como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de unión de radioligando de TGF- β 1 yodado y unión cruzada

Se sembraron células epiteliales Mv1Lu de pulmón de visón en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta confluencia del 90 %. La unión de radioligando y unión cruzada de TGF- β 1 yodado (200 pM) a células Mv1Lu en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de GST-Jun (1-79) o -CystC recombinante se realizó como se ha descrito previamente (44). Después de ello, se aislaron complejos citoquina:receptor, contenidos en extractos de células completas solubilizados con detergente por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-T β R-II como se ha descrito previamente (44). Se visualizó TGF- β 1 unido a T β R-1, T β R-II, y T β R-III de superficie celular por exposición de los geles secos a un tamiz de fósforo que se reveló 1-3 días después en un escáner molecular Dynamic Typhoon. El TGF- β 1 unido total se definió como la suma de intensidades de señales para TGF- β 1, unido de forma cruzada a T β R-1, T β R-II, y T β R-III en cada condición.

Ensayo de unión de TGF-β1 in vitro

Se sembraron células 293T de riñón humano en placas de 6 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche. Las células se transfectaron de forma transitoria la siguiente mañana por exposición durante una noche a liposomas LT1 que contenían 1 µg/pocillo de sTβR-II, que codifica el dominio extracelular de TβR-II que está marcado con Myc-His en su extremo C-terminal, y posteriormente se colocaron en DMEM sin suero durante 24 h adicionales. Después de ello se recogieron los medios condicionados y se aclararon de desechos celulares por microcentrifugación. Los sobrenadantes aclarados resultantes se suplementaron con [¹²⁵I]TGF-β1, junto con o sin CystC recombinante (10 µg/ml), y posteriormente se volteó durante 2 h a 4 °C. Después de ello, se aislaron los complejos TGF-β1:sTβR-II por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-Myc (1 µg/ml; Covance) y se fraccionaron a través de SDS-PAGE al 12 %. Se visualizó TGF-β1 unido a sTβR-II recombinante por una exposición de 1-3 días de los geles secados a un tamiz de fósforo, que posteriormente se reveló en un escáner molecular Dynamic Typhoon.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo demuestra que TGF-β1 induce expresión de CystC en células 3T3-L1.

TGF-β gobierna los microentornos celulares regulando la expresión de fibroblastos y la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, y proteínas ECM que alteran la supervivencia, proliferación, y motilidad de células normales y cancerosas. Para identificar proteínas secretoras de fibroblastos cuya expresión esté regulada por TGF-β, el inventor recogió, concentró y fraccionó por electroforesis 2D proteínas presentes en medios vírgenes y condicionados con TGF-β de fibroblastos 3T3-L1 murinos. Las proteínas fraccionadas se inmovilizaron en Immobilon-P, y se visualizaron por tinción con Coomassie y autorradiografía. Las proteínas expresadas de forma diferencial reguladas por TGF-β se escindieron y sometieron a secuenciación de Edman. Los resultados mostraron que una proteína altamente básica de ~18 kDa se inducía de forma prominente por TGF-β (datos no mostrados). La secuenciación de Edman de esta proteína devolvió una secuencia de aminoácidos de (NH₂)-ATPKQGPR-(COOH) (posiciones 21-28 de la SEQ ID NO: 4), correspondiente a los restos 21-28 de CystC murina.

TGF-β ha demostrado previamente estimular la expresión del transcrito de CystC en células embrionarias murinas (18). Para confirmar que la expresión de CystC estaba de hecho inducida por TGF-β y para establecer el mecanismo para este efecto, se realizó análisis de transferencia de Northern sobre el ARN total aislado de células 3T3-L1 tratadas con TGF-β. Las células 3T3-L1 estimuladas con TGF-β sintetizan transcrito de CystC de un modo dependiente del tiempo (datos no mostrados). Colectivamente, estos hallazgos establecen CystC como una novedosa diana génica para TGF-β en células 3T3-L1, conduciendo finalmente a producción y secreción aumentadas de proteína CystC.

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo muestra que la tumorigénesis altera la expresión de CystC en tejidos humanos.

La expresión alterada de CystC se ha asociado con el desarrollo de patologías humanas, particularmente cáncer (3). Para identificar cánceres humanos potencialmente susceptibles a expresión alterada de CystC, se hibridó una sonda de ADNc de CystC humana radiomarcada a una membrana dispuesta con ADNc normales/tumorales coincidentes generados a partir de pacientes con cáncer (datos no mostrados). La expresión de CystC se normalizó a la de ubiquitina y se determinaron relaciones de expresión de CystC en tejido normal:tumoral. Relaciones ≥2 o ≤0,5 se consideraron significativas. De los 68 pacientes inspeccionados, la expresión de CystC estaba alterada en el 65 % (44/68) de los tumores, de los cuales el 84 % (37/44) mostraba regulación negativa. Fue especialmente evidente una expresión significativamente atenuada de CystC en cánceres de estómago (100 %; 8/8 casos), próstata (100 % 3/3 casos), útero (71 %; 5/7 casos), riñón (60 %; 9/15 casos), recto (57 %; 4/7 casos), y colon (55 %; 6/11 casos). De forma más importante, la expresión de CystC era aberrante en el 69 % de neoplasias humanas metastásicas (15/25), de las cuales el 73 % (11/15) mostró expresión de CystC regulada negativamente. Tomados juntos, estos hallazgos apoyan la noción de que CystC funciona de forma normal para suprimir la formación de tumores, así como los procesos de invasión y metástasis.

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo demuestra que CystC inhibe la invasión mediada por catepsina B en células HT1080.

Catepsina B es una cisteína proteinasa lisosómica que funciona en el catabolismo intracelular de proteínas, así como en la resorción ósea, la activación de hormonas y el procesamiento de antígeno (5). Durante la tumorigénesis, las células cancerosas expresan una variante de corte y empalme de catepsina B cuyo producto proteico se secreta al medio extracelular (5) y se localiza en el borde de avance de tumores invasivos (19), promoviendo de ese modo la invasión y metástasis de células cancerosas. Sin embargo, recientes evidencias han cuestionado el papel de la catepsina B intracelular frente a extracelular en la promoción de la invasión de células tumorales (20). Para distinguir entre estas dos posibilidades, se infectaron células de fibrosarcoma HT1080 que expresan de forma estable el receptor ecotrópico murino (21) con retrovirus de control (es decir, GFP), CystC, o Δ14CystC. Después de ello, se

aislaron las células que expresaban GFP por citometría de flujo para establecer poblaciones policlonales estables de células HT1080 que expresan control, CystC y $\Delta 14$ CystC (datos no mostrados). El inventor eligió estudiar células HT1080 porque son altamente invasivas, y porque expresan grandes cantidades de catepsina B secretada y de forma comparable poca CystC (22). Por tanto, si la catepsina B extracelular media la invasión de célula HT1080, se hipotetiza que la sobreexpresión de CystC secretada atenuaría su invasión a través de membranas basales sintéticas.

En resumen, se permitió que células HT1080 que expresan GFP, CystC, o $\Delta 14$ CystC invadieran a través de membranas recubiertas con Matrigel durante 48 h. Los datos mostrados en la Fig. 1A son la media ($\pm$ ET) de tres ($\Delta 14$ CystC) y nueve (GFP y CystC) experimentos independientes presentados como el porcentaje de invasión relativo a células HT1080 que expresan GFP (***, $p < 0,05$; ensayo T de Student).

Por consiguiente, la expresión de CystC inhibía significativamente la invasión de células HT1080 a través de matrices Matrigel (Fig. 1A). En contraste, la expresión de $\Delta 14$ CystC, que carece del motivo inhibidor de cisteína y por tanto es incapaz de inactivar la catepsina B (23), no lograba afectar a la invasión de células HT1080 (Fig. 1A). Además, el tratamiento de células HT1080 con el inhibidor II de catepsina B impermeable a células (Calbiochem) reducía significativamente su invasión a través de matrices Matrigel (en un $47,1 \pm 8,5$ %; $n = 3$, $p < 0,05$), mientras que el tratamiento con el inhibidor de catepsina B permeable a células, CA-074ME (Calbiochem), no lograba afectar a su capacidad de invasión ($101,0 \pm 5,6$ % del control; $n = 3$).

Tomados juntos, estos hallazgos indican que la invasión de células HT1080 sucede en parte a través de las actividades proteinasa de catepsina B no lisosómica extracelular. Estos hallazgos también sugieren que medidas diseñadas para aumentar las concentraciones de CystC en microentornos tumorales anularían los efectos oncogénicos de catepsina B.

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo muestra que CystC inhibe la expresión del gen indicador sensible a TGF- β mediante un mecanismo independiente de catepsina B en células HT1080.

Durante la tumorigénesis, TGF- β se convierte frecuentemente de un supresor en un promotor del crecimiento, invasión y metástasis de células cancerosas (17, 24). La estimulación de células HT1080 con TGF- β no tuvo efectos sobre la invasión a través de matrices Matrigel, ni sobre la expresión de CystC (datos no mostrados). Por tanto, aunque TGF- β regula claramente la expresión de CystC en embriones murinos (18) y células 3T3-L1 (Ejemplo 1), el acoplamiento de TGF- β a la expresión de CystC en células HT1080 parece estar mal regulado. También se ha informado de que CystC estimula la síntesis de ADN en fibroblastos Swiss 3T3 murinos normales y transformados (10), y en células mesangiales de rata (11), y también inhibe la motilidad de células de melanoma (25). Sin embargo, la sobreexpresión de CystC o $\Delta 14$ CystC en células HT1080 no logró afectar a su síntesis de ADN y migración a fibronectina (datos no mostrados).

La expresión de catepsina B extracelular se ha vinculado a la activación de TGF- β latente a partir de depósitos ECM inactivos (6, 7). El inventor, por lo tanto, hipotetizó que la expresión de CystC podría impactar sobre la señalización de TGF- β mediante un mecanismo dependiente de catepsina B. Para ensayar esta hipótesis, se midieron cambios en la expresión de luciferasa dirigida por el gen indicador p3TP luciferasa sintético (26) en células HT1080 que expresan control y CystC. En resumen, se transfectaron de forma transitoria células HT1080 que expresan GFP, CystC o $\Delta 14$ CystC con p3TP luciferasa y pCMV- β -gal. Los transfectantes se estimularon con concentraciones crecientes de TGF- $\beta 1$ (0-5 ng/ml) según se indica, y posteriormente se procesaron para medir las actividades luciferasa y β -gal. Los datos son la media ($\pm$ ET) de las actividades luciferasa de cuatro experimentos independientes normalizados a células que expresan GFP no tratadas.

Como se muestra en la Fig. 1B, CystC inhibía significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β dirigida por el promotor p3TP. Sorprendentemente, $\Delta 14$ CystC era igual de eficaz que CystC en la inhibición de la actividad luciferasa estimulada por TGF- β (Fig. 1B). Colectivamente, estos hallazgos identifican CystC como un novedoso antagonista de la señalización de TGF- β , haciéndolo a través de una ruta independiente de catepsina B.

Ejemplo 5

El siguiente ejemplo muestra que CystC inhibe la invasión tónica y estimulada por TGF- β en células 3T3-L1.

Se ha informado previamente que CystC regula la proliferación (10, 11) y motilidad (25) celular. Similar a las células HT1080, el inventor descubrió que CystC no lograba afectar a la síntesis de ADN de células 3T3-L1 y la migración a fibronectina (datos no mostrados). Sin embargo, el inventor ha descubierto que los fibroblastos 3T3-L1 invaden a través de matrices Matrigel, y que TGF- β potencia su capacidad de hacerlo (véase a continuación). Para determinar los efectos de CystC sobre la capacidad de invasión de células 3T3-L1, se generaron poblaciones policlonales estables de células 3T3-L1 que expresan GFP, CystC o $\Delta 14$ CystC por infección retroviral bicistónica. En resumen, se infectaron células 3T3-L1 murinas con retrovirus ecotrópico que codificaba GFP (es decir, control), CystC o

D14CystC. Los infectantes se clasificaron por FACS mediante la expresión de GFP (10 % superior) para producir poblaciones policlonales estables de células 3T3-L1 que expresan control, CystC y D14CystC que tienen niveles equivalentes de expresión de GFP a una tasa de positividad de ≥ 90 %. La inmunotransferencia de medio condicionado con células 3T3-L1 con anticuerpos anti-CystC demostró que las células 3T3-L1 transducidas con retrovirus de CystC o D14CystC secretan proteínas CystC recombinantes en el medio. Las líneas celulares 3T3-L1 resultantes tenían purezas del 90 % y expresaban GFP de forma indistinguible (datos no mostrados). Además, las células 3T3-L1 infectadas con retrovirus de CystC o D14CystC expresaban y secretaban niveles altos de proteína CystC recombinante en el medio, mientras que aquellas infectadas con retrovirus de control (es decir, GFP) eran negativas para la expresión de CystC recombinante (datos no mostrados).

Se permitió que células 3T3-L1 que expresan GFP, CystC o $\Delta 14$ CystC invadieran a través de filtros recubiertos con Matrigel en ausencia o presencia de TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) durante 48 h, y los resultados se muestran en la Fig. 2A. Como se esperaba, las células 3T3-L1 invadían fácilmente a través de matrices Matrigel cuando se estimulaban por suero: esta respuesta no estuvo afectada por $\Delta 14$ CystC, pero se inhibía significativamente por CystC (Fig. 2A). La Fig. 2A también muestra que las células 3T3-L1 tratadas con TGF- β mostraban una tendencia hacia invasión potenciada; sin embargo, el tratamiento con TGF- β en combinación con suero inducía significativamente más invasión de células 3T3-L1 que aquella por suero en solitario (Fig. 2A). De forma interesante, la expresión de CystC bloqueaba ambos componentes de la invasión de células 3T3-L1, mientras que $\Delta 14$ CystC bloqueaba solamente el componente dependiente de TGF- β (Fig. 2A). Los datos son la media ($\pm$ ET) de cuatro experimentos independientes presentados como el porcentaje de invasión relativo a células 3T3-L1 que expresan GFP. TGF- $\beta 1$ potenciaba significativamente la invasión de células 3T3-L1 (***, $p < 0,05$; ensayo T de Student). La expresión de CystC inhibía significativamente la invasión de células 3T3-L1 tónica (*, $p < 0,05$; ensayo T de Student) y estimulada por TGF- $\beta 1$ (**, $p < 0,05$; ensayo T de Student), mientras que la expresión de $\Delta 14$ CystC solamente inhibía significativamente la invasión de células 3T3-L1 estimulada por TGF- β (**, $p < 0,05$; ensayo T de Student).

Además, los efectos inhibidores de CystC sobre la invasión de células 3T3-L1 podría recapitularse por la adición de proteínas de fusión de CystC recombinante. Se permitió que células 3T3-L1 de control o estimuladas con TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) invadieran a través de filtros recubiertos con Matrigel durante 48 h en ausencia o presencia de GST, GST-CystC, o GST- $\Delta 14$ CystC, recombinantes (10 mg/ml) como se indica en la Fig. 2B. Como se muestra en la Fig. 2B, el tratamiento de células 3T3-L1 con GST recombinante (10 mg/ml) no lograba afectar a su invasión inducida por suero o suero:TGF- β . En contraste, la administración de CystC recombinante bloqueaba la invasión de célula 3T3-L1 estimulada por suero y suero:TGF- β , mientras que $\Delta 14$ CystC recombinante bloqueaba selectivamente la estimulada por TGF- β (Fig. 2B). Los datos son la media ($\pm$ ET) de tres experimentos independientes presentados como el porcentaje de invasión relativo a células 3T3-L1 no tratadas. TGF- β potenciaba significativamente la invasión de células 3T3-L1 (*, $p < 0,05$; ensayo T de Student). CystC recombinante inhibía significativamente la invasión de células 3T3-L1 tónica (#, $p < 0,05$; ensayo T de Student) y estimulada por TGF- $\beta 1$ (**, $p < 0,05$; ensayo T de Student), mientras que la expresión de $\Delta 14$ CystC solamente inhibía significativamente la invasión de células 3T3-L1 estimulada por TGF- β (**, $p < 0,05$; ensayo T de Student). Colectivamente, estos hallazgos indican que la invasión de células 3T3-L1 progresa a través de rutas dependientes de cathepsina B y dependientes de TGF- β . Además, los hallazgos del presente inventor muestran que CystC anulaba ambas rutas, mientras que $\Delta 14$ CystC bloqueaba solamente la ruta estimulada por TGF- β .

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo demuestra que CystC y $\Delta 14$ CystC inhiben la expresión de gen indicador estimulada por TGF- β en células 3T3-L1.

Los hallazgos del presente inventor de que la señalización de TGF- β se inhibía por CystC (Fig. 1 y 2) independiente de sus acciones sobre cathepsina B les condujo a hipotetizar a CystC como antagonista general de la señalización de TGF- β . Para ensayar esta hipótesis, se controlaron cambios en la actividad luciferasa dirigida por p3TP en células que expresan control, CystC, $\Delta 14$ CystC antes y después de su estimulación con TGF- β . En resumen, se transfectaron de forma transitoria células 3T3-L1 que expresa GFP, CystC, o $\Delta 14$ CystC con p3TP luciferasa y pCMV- β -gal, y posteriormente se estimularon con concentraciones crecientes de TGF- $\beta 1$ (0-5 ng/ml) como se indica en la Fig. 3A. Después de ello, se midieron las actividades luciferasa y β -gal contenidas en extractos celulares solubilizados con detergente. La Fig. 3A muestra que la expresión de CystC o $\Delta 14$ CystC reducía significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β en comparación con células de control. Los datos son la media ($\pm$ ET) de las actividades luciferasa de cuatro experimentos independientes normalizados a células que expresan GFP no tratadas.

Los transfectantes después se estimularon con TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) en ausencia o presencia de GST, GST-CystC, o GST- $\Delta 14$ CystC recombinante (10 mg/ml) como se indica en la Fig. 3B. Similares a sus efectos sobre la invasión de células 3T3-L1, CystC y $\Delta 14$ CystC recombinantes inhibían ambas significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β en células 3T3-L1 (Fig. 3B). Los datos son la media ($\pm$ ET) de las actividades luciferasa de cinco experimentos independientes normalizados a células que expresan GFP no tratadas. CystC y $\Delta 14$ CystC inhibían significativamente la actividad luciferasa estimulada por TGF- β dirigida por el promotor p3TP sintético (***, $p < 0,05$; ensayo T de Student).

Tomados juntos, estos hallazgos identifican CystC como un novedoso antagonista de la señalización de TGF- β , haciéndolo a través de un mecanismo independiente de catepsina B.

Ejemplo 7

El siguiente ejemplo muestra que CystC antagoniza la unión de TGF- β 1 a receptores de TGF- β .

Los hallazgos del presente inventor han identificado hasta la fecha CystC como un novedoso antagonista de TGF- β (Fig. 1-3). La capacidad de CystC recombinante (y Δ 14CystC) de recapitular los efectos inhibidores de la expresión de CystC sobre la señalización de TGF- β conducen al inventor a especular que CystC inhibe la señalización de TGF- β antagonizando la interacción entre TGF- β y sus receptores. Esta hipótesis parecía especialmente atractiva dado el hecho de que el miembro de la familia de cistatina Tipo 3, fetuina (también conocida como α 2-HS-glucoproteína), inhibe la señalización de TGF- β por interacción física con y evitando la unión de TGF- β a sus receptores (27-29).

Se incubaron células epiteliales Mv1Lu de pulmón de visón durante 3 horas a 4 °C con [125I]TGF- β 1 (200 pM) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (0-10 μ g/ml; 0, 0,5, 1, 5, 10) de Jun(1-79) o CystC recombinante. Se unieron de forma cruzada complejos citoquina:receptor mediante la adición de suberato de disuccinimidilo, y posteriormente se aislaron de extractos celulares completos solubilizados con detergente por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-T β R-II. Aunque la co-inmunoprecipitación y los ensayos de arrastre de afinidad no lograron demostrar una interacción física directa entre CystC y TGF- β 1 (datos no mostrados), los ensayos de unión y una unión cruzada de TGF- β 1 yodado mostraron que CystC recombinante inhibía de forma dependiente de la dosis la unión de TGF- β a sus receptores de superficie celular (Fig. 4A). La reducción en la unión de TGF- β 1 era específica para CystC porque concentraciones crecientes de Jun(1-79) recombinante no tenían efectos sobre la unión de TGF- β 1 yodado a sus receptores (Fig. 4A). Se generaron datos basados en la imagen de fósforo representativa de TGF- β 1 yodado unido a T β R-I, T β R-II, y T β R-III. La Fig. 4A representa la unión media de TGF- β 1 ($\pm$ ET) observada en seis experimentos independientes y se presenta como el porcentaje de unión de TGF- β 1 normalizada a aquella en ausencia de proteína de fusión añadida. Este hallazgo implica CystC como un novedoso antagonista del receptor de TGF- β .

La señalización transmembrana por TGF- β comienza por su unión a T β R-III, que después se asocia con y se une a T β R-II, o directamente a T β R-II, que cuando se asocia con y se une a T β R-I (17, 30). El experimento anterior demostró que CystC reducía igualmente la unión de TGF- β 1 a sus tres receptores de superficie celular, lo que sugiere que CystC antagonizaba selectivamente la unión inicial de TGF- β , no su multimerización de receptor posterior. El inventor, por lo tanto, hipotetizó que CystC antagonizaba la unión de TGF- β a T β R-II. Para ensayar esta hipótesis, se realizó un ensayo de captura de TGF- β *in vitro* que medía los efectos de CystC sobre la unión de TGF- β 1 yodado a T β R-II humano soluble. Esta construcción de T β R-II se eligió para el estudio porque se une a TGF- β (31) y se ha usado en sí mismo para antagonizar la señalización de TGF- β (32-34). En resumen, se transfectaron de forma transitoria células 293T humanas con el dominio extracelular de unión a ligando de T β R-II (sT β R-II), que es una proteína secretada soluble. Se recogió el medio condicionado de células 293T transfectadas de forma simulada con sT β R-II y se incubaron durante 2 horas a 4 °C con [125I]TGF- β 1 (200 pM) en ausencia o presencia de CystC recombinante (10 μ g/ml). Se aislaron los complejos citoquina:receptor por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Myc. Como se esperaba, se capturó significativamente más TGF- β 1 yodado por medios condicionados que contenían sT β R-II que lo que se capturaba por el medio de control (Fig. 4B). De forma más importante, CystC recombinante anulaba completamente la unión de TGF- β 1 yodado a sT β R-II (Fig. 4B). El panel superior muestra una autorradiografía representativa de TGF- β 1 yodado unido a sT β R-II, mientras que el panel inferior representa la unión media de TGF- β 1 ($\pm$ ET) de tres experimentos independientes presentados como el porcentaje de unión de TGF- β 1 normalizado a medio condicionado de células transfectadas de forma simulada sin proteína de fusión añadida. sT β R-II potenciaba significativamente la captura de TGF- β 1 de medios condicionados (*, $p < 0,05$; ensayo-T de Student). La unión de TGF- β 1 a sT β R-II se reducía significativamente por CystC recombinante (**, $p < 0,05$; ensayo-T de Student).

Colectivamente, estos hallazgos han identificado CystC como un novedoso antagonista de la señalización de TGF- β , haciéndolo por inhibición de la unión de TGF- β a T β R-II.

Se usaron los siguientes materiales y métodos en los siguientes Ejemplos 8-9.

Expresión de CystC recombinante, y purificación

La síntesis de vectores bacterianos de expresión que codifican CystC o Δ 14CystC fusionada al extremo C-terminal de GDT, así como su purificación a partir de *E. coli* transformada se describieron en los Ejemplos 1-7 anteriores.

Expresión retroviral de CystC

La creación de vectores retrovirales bicistronicos (es decir, pMSCV-IRES-GFP) que codifican CystC humana o Δ 14CystC se describieron previamente en los Ejemplos 1-7 anteriores. Se infectaron MEC NMuMG de ratón y

fibroblastos renales NRK de rata durante una noche con sobrenadante retrovíricos de control (es decir, pMSCV-IRES-GFP), CystC, o $\Delta 14$ CystC producidos por células de empaquetado retrovítico EcoPac2 (Clontech) como se ha descrito anteriormente. Se aislaron las células que expresaban GFP y se recogieron 48 horas después en un clasificador celular MoFlo (Cytomation), y posteriormente se expandieron para producir poblaciones policlonales estables de células que expresan control, CystC o $\Delta 14$ CystC. La expresión y secreción de proteínas CystC recombinantes por células NMuMG y NRK infectadas se controló por inmunotransferencia de medios condicionados con anticuerpos anti-CystC como se ha descrito anteriormente.

Estudios de inmunofluorescencia

Se controló la capacidad de TGF- β de alterar la arquitectura citoesquelética de actina y la expresión de E-cadherina esencialmente como se ha descrito (Piek et al., 1999). En resumen, se permitió que células NMuMG que expresan control, CystC, o $\Delta 14$ CystC se adhirieran durante una noche a cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se estimularon el siguiente día con TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) durante 0-36 horas a 37 °C. En algunos experimentos, se estimularon células NMuMG de control con TGF- $\beta 1$ en ausencia o presencia de 10 μ g/ml de GST, GST-CystC o GST- $\Delta 14$ CystC recombinante. Tras completarse la estimulación agonista, las células se lavaron en PBS enfriado en hielo y se fijaron inmediatamente en formaldehído al 3,7 %. Después de lavado extensivo en PBS, las células se bloquearon en PBS suplementado con FBS al 1,5 %, seguido por incubación con rodamina-faloidina (0,25 μ M). Como alternativa, las células se bloquearon en γ -globulina de cabra (200 μ g/ml; Jackson Immunoresearch) antes de visualización de E-cadherina por incubaciones secuenciales con anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina (dilución 1:50; BD Bioscience), seguido por anticuerpo de cabra biotinilado anti-ratón (5 μ g/ml; Jackson Immunoresearch), y finalmente por Alexa estreptavidina (1,2 μ g/ml; Molecular Probes). Se capturaron imágenes en un microscopio Nikon Diaphot.

También se controló la capacidad de TGF- β de alterar la expresión de E-cadherina por inmunoprecipitación de E-cadherina en extractos celulares completos NMuMG solubilizados con tampón H/Tritón X-100 al 1 % (Schiemann et al., 2003), seguido por inmunotransferencia con anticuerpos anti-E-cadherina (dilución 1:1000).

Ensayo en agar blando

Se realizó cultivo de células NRK en agar blando de acuerdo con los procedimientos descritos en (Moustakas et al., 1999). En resumen, se cultivaron cultivos duplicados de células NRK que expresan control, CystC, o $\Delta 14$ CystC (10.000 células/placa) en agar al 0,3 % en una almohadilla de agar al 0,6 % en placas de 35 mm. Se permitió que el crecimiento de células NRK en ausencia o presencia de TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) continuara durante 7 días, después de lo cual se cuantificó la cantidad de colonias formadas en un microscopio óptico.

Ejemplo 8

El siguiente ejemplo demuestra que CystC evita la estimulación por TGF- β de EMT en células NMuMG.

La importancia de EMT en la promoción de la progresión del cáncer y metástasis tumoral cada vez es más evidente (Thiery, 2002; Grunert, 2003). Aunque la formación y crecimiento de tumores en fase prematura está normalmente suprimida por TGF- β , la progresión del cáncer típicamente posibilita que TGF- β estimule el crecimiento y metástasis de tumores en fase tardía, en parte a través de su inducción de EMT (Grunert, 2003). El inventor describe en los Ejemplos 1-7 anteriores el inhibidor de cisteína proteasa CystC como un novedoso antagonista de T β R-II. De hecho, la asociación física de CystC con T β R-II no solamente evitaba la unión de TGF- β y, por consiguiente, la señalización de TGF- β en células normales y cancerosas, sino que también inhibía su invasión a través de membranas basales sintéticas. De forma colectiva, estos hallazgos condujeron al inventor a hipotetizar CystC como un novedoso agente quimiopreventivo capaz de antagonizar la oncogenicidad de TGF- β en tumores en fase tardía, particularmente la capacidad de TGF- β de inducir EMT.

Para ensayar esta hipótesis, el inventor examinó primero si CystC y un mutante de CystC alterado en su capacidad de inhibir la actividad proteasa de cathepsina (es decir, $\Delta 14$ CystC) podría antagonizar la estimulación por TGF- β de EMT en MEC. En contraste con tejidos en desarrollo, la inducción inapropiada de EMT por TGF- β en tejidos adultos potencia la tumorigénesis. La estimulación por TGF- β de EMT se estudia de forma rutinaria en MEC NMuMG murinas, que experimentan fácilmente EMT cuando se tratan con TGF- β (Piek et al., 1999; Miettinen et al., 1994; Gotzmann et al., 2004). En resumen, se estimularon células NMuMG con TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) durante 0-24 horas en presencia de 10 μ g/ml de GST, GST-CystC, o GST- $\Delta 14$ CystC. Después de ello, se visualizó arquitectura citoesquelética de actina alterada por inmunofluorescencia directa con rodamina-faloidina. En un segundo experimento, se estimularon células NMuMG con TGF- β (5 ng/ml) durante 36 horas en presencia de proteínas de fusión con GST como anteriormente. Se controló la expresión de E-cadherina por inmunofluorescencia directa con anticuerpos anti-E-cadherina. Los resultados (datos no mostrados) demostraron que células NMuMG no estimuladas mostraban morfología epitelial en forma de cubo típica caracterizada por tinción de actina cortical fuerte y citoplasmática difusa. En presencia de TGF- β , las células NMuMG transicionan a fibroblastos y muestran distintas fibras de estrés de actina que emanan de adhesiones focales.

En otro experimento, se infectaron células NMuMG con retrovirus ecotrópico que codifica GFP (es decir, control), CystC, o $\Delta 14$ CystC, y posteriormente se aislaron por clasificación FACS para la expresión de GFP para producir poblaciones policlonales estables de células que expresan control, CystC, y $\Delta 14$ CystC. La expresión y secreción de proteínas CystC recombinantes por células NMuMG y NRK infectadas se controló por inmunotransferencia de medios condicionados con anticuerpos anti-CystC. Las mismas células se incubaron en ausencia o presencia de TGF- β (5 ng/ml) durante 8 horas, después de lo cual se visualizaron alteraciones en la arquitectura citoesquelética de actina por inmunofluorescencia directa de rodamina-faloidina. A continuación, se incubaron células NMuMG que expresan control, CystC, y $\Delta 14$ CystC en ausencia o presencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 36 horas, después de lo cual se controló la expresión de E-cadherina por inmunotransferencia con anticuerpos anti-E-cadherina. Finalmente, se permitió que células NMuMG que expresan control, CystC, y $\Delta 14$ CystC invadieran a través de matrices Matrigel en ausencia o presencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 48 horas.

El tratamiento con CystC recombinante o $\Delta 14$ CystC o su sobreexpresión en células NMuMG evitaba la reorganización citoesquelética de actina estimulada por TGF- β , y también antagonizaba la regulación negativa mediada por TGF- β de E-cadherina (Fig. 5A; los valores representan regulación negativa de la expresión de E-cadherina inducida por TGF- β respecto a células NMuMG no tratadas coincidentes; este experimento representativo se repitió dos veces con resultados similares). Además, células NMuMG que experimentan EMT muestran invasión elevada a través de membranas basales sintéticas (Fig. 5B). Similar a sus acciones sobre células 3T3-L1, la expresión de CystC y $\Delta 14$ CystC también inhibía y delimitaba la invasión dependiente de cathepsina y TGF- β en células NMuMG (Fig. 5B). Los valores son la media ($\pm$ ET) de tres experimentos independientes presentados como el porcentaje de invasión relativa a células NMuMG que expresan GFP. TGF- β 1 potenciaba significativamente la invasión de células NMuMG (*, $p < 0,05$; ensayo-T de Student), una respuesta que se inhibió significativamente por la expresión de CystC y $\Delta 14$ CystC (#, $p < 0,05$; ensayo-T de Student). La expresión de CystC también inhibía significativamente la invasión tónica de células NMuMG (*, $p < 0,05$; ensayo-T de Student).

Colectivamente, estos hallazgos muestran que CystC y $\Delta 14$ CystC de hecho inhiben de forma eficaz EMT e invasión de células mamarias estimuladas por TGF- β . Además, estos hallazgos sugieren que terapias futuras empleando CystC o $\Delta 14$ CystC demostrarán ser eficaces en el alivio de la progresión de tumor en fase tardía estimulada por TGF- β .

Ejemplo 9

El siguiente ejemplo muestra que CystC previene la estimulación por TGF- β de la transformación morfológica en células NRK.

La pérdida de polaridad celular y la capacidad de las células cancerosas de crecer de forma autónoma de un modo independiente de anclaje es una marca distintiva del cáncer (Thiery, 2002; Grunert et al., 2003). TGF- β se describió originalmente como un factor secretado que estimula la transformación morfológica en células renales NRK-49 de rata, conduciendo a su adquisición de crecimiento independiente de anclaje en agar blando (Roberts et al., 1981; Assoian et al., 1983). Por tanto, además de promover EMT, TGF- β también potencia la progresión del cáncer estimulando la transformación morfológica y el crecimiento celular independiente de anclaje. Como CystC y $\Delta 14$ CystC eliminaban ambas EMT estimulada por TGF- β , el presente inventor hipotetizó que estos antagonistas de T β R-II inhibirían de forma similar la transformación morfológica de células NRK estimulada por TGF- β .

Esta hipótesis se ensayó infectando células NRK con retrovirus bicistrónico que codifica CystC o $\Delta 14$ CystC para determinar sus efectos sobre el crecimiento independiente de anclaje de NRK estimulado por TGF- β . En resumen, se infectaron fibroblastos renales NRK de rata con sobrenadantes retrovíricos control (es decir, pMSCV-IRES-GFP), CystC, o $\Delta 14$ CystC, y las células infectadas resultantes se aislaron por fluorescencia GFP en un clasificador de células MoFlo 48 horas después. Se cultivaron células NRK que expresan control, CystC, y $\Delta 14$ CystC en agar blando en ausencia o presencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 7 días, después de lo cual se cuantificó la formación de colonias NRK por microscopía óptica. Además, se permitió que células NRK que expresan control, CystC, y $\Delta 14$ CystC invadieran a través de matrices Matrigel en ausencia o presencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 48 horas.

Como se esperaba, el tratamiento con TGF- β posibilitó que las células NRK crecieran de un modo independiente de anclaje cuando se cultivaban en agar blando (Fig. 6A). Los valores son la media ($\pm$ ET) de la formación de colonias por campo de microscopio observado en cinco experimentos independientes. Similar a sus actividades inhibitoras en células NMuMG, la expresión mediada por retrovirus de CystC o de $\Delta 14$ CystC en células NRK prevenía completamente la transformación morfológica estimulada por TGF- β (Fig. 6A), así como la estimulación por TGF- β de la invasión de células NRK a través de membranas basales sintéticas (Fig. 6B). Los valores son la media ($\pm$ ET) de tres experimentos independientes presentados como el porcentaje de invasión relativo a células NRK que expresan GFP. TGF- β 1 potenció significativamente la invasión de células NRK (*, $p < 0,05$; ensayo-T de Student). Esta respuesta de TGF- β se inhibió significativamente por la expresión de CystC y de $\Delta 14$ CystC (#, $p < 0,05$; ensayo-T de Student), mientras que la invasión tónica de células NRK se inhibía solamente de forma significativa por la expresión de CystC (*, $p < 0,05$; ensayo-T de Student).

Por tanto, además de prevenir la estimulación por TGF- β de EMT, CystC y Δ 14CystC también inhiben de forma eficaz la transformación morfológica y el crecimiento independiente de anclaje estimulado por TGF- β .

Referencias

- 5 1. Vray et al., Cell. Mol. Life Sci., 59: 1503-1512, 2002.
2. Brown y Dziegielewska, Protein Sci., 6: 5-12, 1997.
3. Kos et al., Int. J. Biol. Markers, 15: 84-89, 2000.
4. Yan, S., Sameni, M., y Sloane, B. F., Biol. Chem., 379: 113-123, 1998.
- 10 5. Mort, J. S. y Buttle, D. J., Int. J. Biochem. Cell Biol., 29: 715-720, 1997.
6. Somanna et al., J. Biol. Chem., 277: 25305-25312, 2002.
7. Guo et al., J. Biol. Chem., 277: 14829-14837, 2002.
8. Nycander et al., FEBS Lett., 422: 61-64, 1998.
9. Bjork et al., Biochemistry, 35: 10720-10726, 1996.
- 15 10. Sun, Exp. Cell Res., 180: 150-160, 1989.
11. Tavera et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 182: 1082-1088, 1992.
12. Olafsson et al., Brain Pathol., 6: 121-126, 1996.
13. Schuck et al., Nephron. Clin. Pract., 93: c146-151, 2003.
14. Zore et al., Biol. Chem., 382: 805-810, 2001.
- 20 15. Kos et al., Clin. Chem., 44: 2556-2557, 1998.
16. De Vos et al., Oncogene, 21: 6848-6857, 2002.
17. Blobbe et al., N. Engl. J. Med., 342: 1350-1358, 2000.
18. Solem et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 172: 945-951, 1990.
19. Calkins et al., J. Histochem. Cytochem., 46: 745-751, 1998.
- 25 20. Szpadarska y Frankfater, Cancer Res., 61: 3493-3500, 2001.
21. Hua et al., Genes Dev., 12: 3084-3095, 1998.
22. Corticchiato et al., Int. J. Cancer, 52: 645-652, 1992.
23. Auerswald et al., Eur. J. Biochem., 209: 837-845, 1992.
24. Massague et al., Cell, 103: 295-309, 2000.
- 30 25. Sexton y Cox, Melanoma Res., 7: 97-101, 1997.
26. Wrana et al., Cell, 71: 1003-1014, 1992.
27. Szweras et al., J. Biol. Chem., 277: 19991-19997, 2002.
28. Binkert et al., J. Biol. Chem., 274: 28514-28520, 1999.
29. Demetriou et al., J. Biol. Chem., 271: 12755-12761, 1996.
- 35 30. Massague, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 1: 169-178, 2000.
31. Lin et al., J. Biol. Chem., 270: 2747-2754, 1995.
32. Rowland-Goldsmith et al., Clin. Cancer Res., 7: 2931-2940, 2001.
33. Smith et al., Circ. Res., 84: 1212-1222, 1999.
34. Won et al., Cancer Res., 59: 1273-1277, 1999.
- 40 35. Liotta y Kohn, Nature, 411: 375-379, 2001.
36. Elenbaas y Weinberg, Exp. Cell Res., 264: 169-184, 2001.
37. Konduri et al., Oncogene, 21: 8705-8712, 2002.
38. Coulibaly et al., Int. J. Cancer, 83: 526-531, 1999.
39. Derynck et al., Nat. Genet., 29: 117-129, 2001.
- 45 40. Wakefield et al., J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 6: 67-82, 2001.
41. Huh et al., Mol. Pathol., 52: 332-340, 1999.
42. Schiemann et al., J. Biol. Chem., 277: 27367-27377, 2002.
43. Schiemann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5361-5365, 1995.
44. Schiemann et al., Blood, 94: 2854-2861, 1999.
- 50 45. Thiery, Nat Rev Cancer 2002, 2:442-454.
46. Grunert et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4:657-665.
47. Yoshida et al., J Natl Cancer Inst 2000, 92:1717-1730.
48. Fidler, Differentiation 2002, 70:498-505.
49. Siegel y Massague, Nat Rev Cancer 2003, 3:807-821.
- 55 50. Wakefield y Roberts, Curr Opin Genet Dev 2002, 12:22-29.
51. Cui et al., Cell 1996, 86:531-542.
52. Tang et al., J Clin Invest 2003, 112:1116-1124.
53. Sokol et al., Mol Cancer Res 2004, 2:183-195.
54. Piek et al., J Cell Sci 1999, 112:4557-4568.
- 60 55. Schiemann et al., Mol Biol Cell 2003, 14:3977-3988.
56. Moustakas et al., J Cell Sci 1999, 112:1169-1179.
57. Miettinen et al., J Cell Biol 1994, 127:2021-2036.
58. Gotzmann et al., Mutat Res 2004, 566:9-20.
59. Roberts et al., Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78:5339-5343.
- 65 60. Assoian et al., J Biol Chem 1983, 258:7155-7160.
61. Oft et al., Curr Biol 1998, 8:1243-52.

62. Oft et al., Genes Dev 1996, 10:2462-2477.
63. Portella et al., Cell Growth Differ 1998, 9:393-404.
64. Oft et al., Nat Cell Biol 2002, 4:487-494.
- 5 65. Janda et al., J Cell Biol 2002, 156:299-313.
66. Bhowmick et al., Mol Biol Cell 2001, 12:27-36.
67. Bhowmick et al., J Biol Chem 2001, 276:46707-46713.
68. Bakin et al., J Biol Chem 2000, 275:36803-36810.
69. Yu et al., EMBO J 2002, 21:3749-3759.
70. Kowanetz et al., Mol Cell Biol 2004, 24:4241-4254.
- 10 71. Kang y Massague, Cell 2004, 118:277-279.
72. Huber et al., J Clin Invest 2004, 114:569-581.
73. Turk et al., Adv Enzyme Regul 2002, 42:285-303.
74. Turk B et al., Biochim Biophys Acta 2000, 1477:98-111.
75. Roshly et al., Cancer Metastasis Rev 2003, 22:271-286.
- 15 76. Gantt et al., J Immunol 2003, 170:2613-2620.
77. Sinha et al., Prostate 1995, 26:171-178.
78. Sameni et al., Neoplasia 2000, 2:496-504.
79. Choong y Nadesapillai, Clin Orthop 2003, 415:S46-S58.
- 20 80. Base de datos Biosis [Online] Biosciences Information Service, Philadelphia, PA, US; enero de 2003, Ogawa Msahiro et al: "In vitro anti-cancer activities in Caco-2 and HCT-116 cells of recombinant cystatin C prepared by a Pichia expression system"
81. Documento DE 37 24 581, Gruenenthal GmbH

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> National Jewish Medical and Research Center Schiemann, William P.
- <120> Cistatina C como antagonista de TGF- β y métodos relacionados con la misma
- 30 <130> 2879-104-PCT
- <140> Aún no asignado
- <141> 15-10-2004
- 35 <150> 60/511.794
- <151> 15-10-2003
- <160> 10
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 818
- <212> ADN
- 45 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- <222> (76)..(516)
- 50 <223>
- <400> 1

```

cgagcggggt cctctctatc tagctccagc ctctcgctg cgccccactc cccgcgtccc 60
gcgtcctagc cgacc atg gcc ggg ccc ctg cgc gcc ccg ctg ctc ctg ctg 111
      Met Ala Gly Pro 5 Leu Arg Ala Pro Leu Leu Leu
      1
gcc atc ctg gcc gtg gcc ctg gcc gtg agc ccc gcg gcc ggc tcc agt 159
Ala Ile Leu Ala Val Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Gly Ser Ser
      15      20      25
ccc ggc aag ccg ccg cgc ctg gtg gga ggc ccc atg gac gcc agc gtg 207
Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val
      30      35      40
gag gag gag ggt gtg cgg cgt gca ctg gac ttt gcc gtc ggc gag tac 255
Glu Glu Glu Gly Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Gly Glu Tyr
      45      50      55      60
aac aaa gcc agc aac gac atg tac cac agc cgc gcg ctg cag gtg gtg 303
Asn Lys Ala Ser Asn Asp Met Tyr His Ser Arg Ala Leu Gln Val Val
      65      70      75
cgc gcc cgc aag cag atc gta gct ggg gtg aac tac ttc ttg gac gtg 351
Arg Ala Arg Lys Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val
      80      85      90
gag ctg ggc cga acc acg tgt acc aag acc cag ccc aac ttg gac aac 399
Glu Leu Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn
      95      100      105
tgc ccc ttc cat gac cag cca cat ctg aaa agg aaa gca ttc tgc tct 447
Cys Pro Phe His Asp Gln Pro His Leu Lys Arg Lys Ala Phe Cys Ser
      110      115      120
ttc cag atc tac gct gtg cct tgg cag ggc aca atg acc ttg tcg aaa 495
Phe Gln Ile Tyr Ala Val Pro Trp Gln Gly Thr Met Thr Leu Ser Lys
      125      130      135      140

tcc acc tgt cag gac gcc tag gggctctgtac cgggctggcc tgtgcctatc 546
Ser Thr Cys Gln Asp Ala
      145

acctcttatg cacacctccc acccctgta ttcccacccc tggactgggtg gcccctgcct 606
tggggaaggt ctcccatgt gcctgcacca ggagacagac agagaaggca gcaggcggcc 666
tttgctgctc agcaaggggc tctgccctcc ctcttctctt cttgcttctc atagccccgg 726
tgtgcgggtgc atacaccccc acctcctgca ataaaatagt agcatcggca aaaaaaaaaa 786
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 818

```

<210>
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2

Met Ala Gly Pro Leu Arg Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ile Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Gly Ser Ser Pro Gly Lys Pro
 20 25 30
 Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly
 35 40 45
 Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Gly Glu Tyr Asn Lys Ala Ser
 50 55 60
 Asn Asp Met Tyr His Ser Arg Ala Leu Gln Val Val Arg Ala Arg Lys
 65 70 75 80
 Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly Arg
 85 90 95
 Thr Thr Cys Thr Lys Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His
 100 105 110
 Asp Gln Pro His Leu Lys Arg Lys Ala Phe Cys Ser Phe Gln Ile Tyr
 115 120 125
 Ala Val Pro Trp Gln Gly Thr Met Thr Leu Ser Lys Ser Thr Cys Gln
 130 135 140
 Asp Ala
 145

<210> 3
 <211> 749
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (93)..(515)
 <223>

<400> 3

```

ggcatttggg taaaagtcgc acggagtagc agcgtctgtt ctgcaccaac tcagagtctt      60
gttggagctt tatccctttg tcctagccaa cc atg gcc agc ccg ctg cgc tcc      113
                                   Met Ala Ser Pro Leu Arg Ser
                                   1 5
ttg ctg ttc ctg ctg gcc gtc ctg gcc gtg gcc tgg gcg gcg acc cca      161
Leu Leu Phe Leu Leu Ala Val Leu Ala Val Ala Trp Ala Ala Thr Pro
                                   10 15 20
aaa caa ggc ccg cga atg ttg gga gcc ccg gag gag gca gat gcc aat      209
Lys Gln Gly Pro Arg Met Leu Gly Ala Pro Glu Glu Ala Asp Ala Asn
                                   25 30 35
gag gaa ggc gtg cgg cga gcg ttg gac ttc gct gtg agc gag tac aac      257
Glu Glu Gly Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Ser Glu Tyr Asn
                                   40 45 50 55
aag ggc agc aac gat gcg tac cac agc cgc gcc ata cag gtg gtg aga      305
Lys Gly Ser Asn Asp Ala Tyr His Ser Arg Ala Ile Gln Val Val Arg
                                   60 65 70
gct cgt aag cag ctc gtg gct gga gtg aac tat ttt ttg gat gtg gag      353
Ala Arg Lys Gln Leu Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu
                                   75 80 85
atg gcc cga act aca tgt acc aag tcc cag aca aat ttg act gac tgt      401
Met Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Ser Gln Thr Asn Leu Thr Asp Cys
                                   90 95 100
cct ttc cat gac cag ccc cat ctg atg agg aag gca ctc tgc tcc ttc      449
Pro Phe His Asp Gln Pro His Leu Met Arg Lys Ala Leu Cys Ser Phe
                                   105 110 115
cag atc tac agc gtg ccc tgg aaa ggc aca cac tcc ctg aca aaa ttc      497
Gln Ile Tyr Ser Val Pro Trp Lys Gly Thr His Ser Leu Thr Lys Phe
                                   120 125 130 135
agc tgc aaa aat gcc taa gggctgagtc tagaaggatc atgcagactg      545
Ser Cys Lys Asn Ala
                                   140
ttccttactt gtgctccttc cctatagtgt ttcattctgc agaaggggtgc tccggctctg      605
gagggcaccg ccagtgtgtt tgcaccagga gacagtaaag gagctgctgc aggcaggttc      665
tgcacatctg aacagctgtc ccttggtcc actcttcttg cagtacctgc catgccttgc      725
tcaattaaaa aaaaaaaaaa ttcg      749

```

<210> 4

<211> 140

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

```

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

```

```

Val Ala Trp Ala Ala Thr Pro Lys Gln Gly Pro Arg Met Leu Gly Ala

```

ES 2 576 195 T3

	20		25		30										
Pro	Glu	Glu	Ala	Asp	Ala	Asn	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Ala	Leu	Asp
		35					40					45			
Phe	Ala	Val	Ser	Glu	Tyr	Asn	Lys	Gly	Ser	Asn	Asp	Ala	Tyr	His	Ser
	50					55					60				
Arg	Ala	Ile	Gln	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Lys	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Val
65					70					75					80
Asn	Tyr	Phe	Leu	Asp	Val	Glu	Met	Gly	Arg	Thr	Thr	Cys	Thr	Lys	Ser
				85					90					95	
Gln	Thr	Asn	Leu	Thr	Asp	Cys	Pro	Phe	His	Asp	Gln	Pro	His	Leu	Met
			100					105					110		
Arg	Lys	Ala	Leu	Cys	Ser	Phe	Gln	Ile	Tyr	Ser	Val	Pro	Trp	Lys	Gly
		115					120					125			
Thr	His	Ser	Leu	Thr	Lys	Phe	Ser	Cys	Lys	Asn	Ala				
	130					135					140				

<210> 5
 <211> 714
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (53)..(475)
 <223>

<400> 5


```

gggtaaaagc cgcgctgtcc tctcctctgc accgactctg tctgcggaa cc atg gcc 58
                                   Met Ala
                                   1

agc ccg ctg cgc tcc ttg atg cta ctg ctg gcc gtc ctg gcc gtg gcc 106
Ser Pro 5 Leu Arg Ser Leu Met 10 Leu Leu Leu Ala Val 15 Leu Ala Val Ala

tgg gcc gga acc tcc agg cca ccc ccg cga ttg ttg gga gct ccg cag 154
Trp Ala Gly Thr Ser Arg Pro Pro Pro Arg Leu 30 Leu Gly Ala Pro Gln

gag gca gat gcc agc gag gag ggc gtg cag cga gcg ttg gac ttc gcc 202
Glu Ala Asp Ala Ser Glu Glu Gly Val Gln Arg Ala Leu Asp Phe Ala 50
35 40 45 50

gta agc gag tac aac aag ggc agc aac gat gcg tac cac agc cgc gcc 250
Val Ser Glu Tyr Asn Lys Gly Ser Asn 60 Asp Ala Tyr His Ser Arg Ala 65
55 60 65

ata cag gtg gtg aga gct cgt aag cag ctt gtg gct gga ata aac tat 298
Ile Gln Val Val Arg Ala Arg Lys Gln Leu Val Ala Gly Ile Asn Tyr 70 75 80

tat ttg gat gtg gag atg ggc cga act aca tgt acc aag tcc cag aca 346
Tyr Leu Asp Val Glu Met Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Ser Gln Thr

      85              90              95

aat ttg act aac tgt cct ttc cac gac cag ccc cat ctg atg agg aag 394
Asn Leu Thr Asn Cys Pro Phe His Asp Gln Pro His Leu Met Arg Lys 100 105 110

gca ctc tgc tcc ttc cag atc tac agc gtg ccc tgg aaa ggc aca cac 442
Ala Leu Cys Ser Phe Gln Ile Tyr Ser Val Pro Trp Lys Gly Thr His 115 120 125 130

acc ctg aca aaa tcc agc tgc aaa aat gcc taa gagctgagtc tcataggacc 495
Thr Leu Thr Lys Ser Ser Cys Lys Asn Ala 135 140

atgccaatgg tcccttactt gttcccctac cctgtagtgt ttatccctg agaagggtgc 555

tccagctctg gagggcatct ccggggtgtt cccaccagga gacagtaaag aagctgctgc 615

aggcagggtc tgcacgtcag aacagctgtc ccttggttct cttctccttg cagtacctgt 675

cataccttgc tcttgctcaa ttaaaaaatt taaaaaatg 714

```

<210> 6
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 6

Met Ala Ser Pro Leu Arg Ser Leu Met Leu Leu Leu Ala Val Leu Ala
1 5 10 15
Val Ala Trp Ala Gly Thr Ser Arg Pro Pro Pro Arg Leu Leu Gly Ala
20 25 30
Pro Gln Glu Ala Asp Ala Ser Glu Glu Gly Val Gln Arg Ala Leu Asp
35 40 45
Phe Ala Val Ser Glu Tyr Asn Lys Gly Ser Asn Asp Ala Tyr His Ser
50 55 60
Arg Ala Ile Gln Val Val Arg Ala Arg Lys Gln Leu Val Ala Gly Ile
65 70 75 80
Asn Tyr Tyr Leu Asp Val Glu Met Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Ser
85 90 95
Gln Thr Asn Leu Thr Asn Cys Pro Phe His Asp Gln Pro His Leu Met
100 105 110
Arg Lys Ala Leu Cys Ser Phe Gln Ile Tyr Ser Val Pro Trp Lys Gly
115 120 125
Thr His Thr Leu Thr Lys Ser Ser Cys Lys Asn Ala
130 135 140

<210> 7
<211> 735
<212> ADN
<213> *Bos taurus*

<220>
<221> CDS
<222> (56)..(502)
<223>

<400>7

atgctagcac ccgcggatcg cccctcgact gcagctctttt tgcacccgag agacc atg 58
Met
1

gtg ggc tcc ccg cgc gcc cca ctg ctc ctg ctg gca tcc ctg atc gtc 106
Val Gly Ser Pro Arg Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ile Val
5 10 15

gcc ctg gcc ctg gcc ctg gcc gtg agc ccc gcg gca gcg cag ggc cct 154
Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Ala Gln Gly Pro
20 25 30

agg aag ggt cgc ctg ctg ggc ggc ctg atg gag gcg gac gtc aat gag 202
Arg Lys Gly Arg Leu Leu Gly Gly Leu Met Glu Ala Asp Val Asn Glu
35 40 45

gag ggc gtg cag gag gcg ctg tcc ttt gcg gtc agc gag ttc aac aag 250
Glu Gly Val Gln Glu Ala Leu Ser Phe Ala Val Ser Glu Phe Asn Lys
50 55 60 65

cgg agc aac gac gct tac cag agc cgc gtg gtg cgc gtg gtg cgc gcc 298
Arg Ser Asn Asp Tyr Gln Ser Arg Val Val Arg Val Val Arg Ala
70 75 80

cgc aag cag gtc gtg tca ggg atg aac tat ttc ttg gac gtg gag ctt 346
Arg Lys Gln Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu
85 90 95

ggc cgg act aca tgt acc aag tcc cag gcc aac tta gac agc tgt ccc 394
Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Ser Gln Ala Asn Leu Asp Ser Cys Pro
100 105 110

ttc cat aac cag ccg cac ctg aag agg gaa aag ctg tgc tcc ttc cag 442
Phe His Asn Gln Pro His Leu Lys Arg Glu Lys Leu Cys Ser Phe Gln
115 120 125

gtt tac gtc gtc cca tgg atg aac acc atc aac ctg gtg aag ttt agc 490
Val Tyr Val Val Pro Trp Met Asn Thr Ile Asn Leu Val Lys Phe Ser
130 135 140 145

tgc cag gat taa caggcaggcc actgaccgcc tctcactcat gctcctgcag 542
Cys Gln Asp

agtgccacaca cttgtggtgg gtgactgcct actggccgtg ccttccccat gccgcccctg 602

cagacacagg ctctttgggc attgtctgat ctgccagggg gactctaact cgtttctttc 662

ttctaattgc ttccaagtg catggtgctc tgctatttta ctcaataaaa aagtaacagc 722

agctaaaaaa aaa 735

<210> 8
<211> 148
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<400> 8

Met Val Gly Ser Pro Arg Ala Pro Leu Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ile
1 5 10 15
Val Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Ala Gln Gly
20 25 30
Pro Arg Lys Gly Arg Leu Leu Gly Gly Leu Met Glu Ala Asp Val Asn
35 40 45
Glu Glu Gly Val Gln Glu Ala Leu Ser Phe Ala Val Ser Glu Phe Asn
50 55 60
Lys Arg Ser Asn Asp Ala Tyr Gln Ser Arg Val Val Arg Val Val Arg
65 70 75 80
Ala Arg Lys Gln Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu
85 90 95
Leu Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Ser Gln Ala Asn Leu Asp Ser Cys
100 105 110
Pro Phe His Asn Gln Pro His Leu Lys Arg Glu Lys Leu Cys Ser Phe
115 120 125
Gln Val Tyr Val Val Pro Trp Met Asn Thr Ile Asn Leu Val Lys Phe
130 135 140
Ser Cys Gln Asp
145

<210> 9
<211> 441
<212> ADN
<213> *Macaca mulatta*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(441)
<223>

<400> 9

atg gcc ggg ccc ctg cgc gcc ccg ctg ctc ctg ctg gcc atc ctg gcc Met Ala Gly Pro Leu Arg Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ile Leu Ala 1 5 10 15	48
gtg gct ctg gca gtg agc ccc gcg gcc gga gcg agt ccc ggg aag ccg Val Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Gly Ala Ser Pro Gly Lys Pro 20 25 30	96
ccg cgc cta gtg ggc ggc ccc atg gac gcc agc gtg gag gag gag ggt Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly 35 40 45	144
gtg cgg cgt gcc ctg gac ttt gcc gtc agc gag tac aac aaa gcc agc Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Ser Glu Tyr Asn Lys Ala Ser 50 55 60	192
aac gac atg tac cac agc cgc gcg ctg cag gtg gtg cgc gcc cgc aag Asn Asp Met Tyr His Ser Arg Ala Leu Gln Val Val Arg Ala Arg Lys 65 70 75 80	240
cag atc gta gct ggg gtg aac tac ttc ttg gac gtg gag ttg ggc cga Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly Arg 85 90 95	288
acc aca tgt acc aag acc cag ccc aac ttg gac aac tgc ccc ttc cat Thr Thr Cys Thr Lys Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His 100 105 110	336
gaa cag cca cat ctg aag agg aaa gca ttc tgc tct ttc cag atc tac Glu Gln Pro His Leu Lys Arg Lys Ala Phe Cys Ser Phe Gln Ile Tyr 115 120 125	384
act gtg cct tgg cag ggc aca atg acc ttg tcg aaa tcc acc tgt cag Thr Val Pro Trp Gln Gly Thr Met Thr Leu Ser Lys Ser Thr Cys Gln 130 135 140	432
gac gcc tag Asp Ala 145	441

<210> 10

<211> 146

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 10

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

Val Ala Leu Ala Val Ser Pro Ala Ala Gly Ala Ser Pro Gly Lys Pro
20 25 30

Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Gly
35 40 45

Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Ser Glu Tyr Asn Lys Ala Ser
50 55 60

Asn Asp Met Tyr His Ser Arg Ala Leu Gln Val Val Arg Ala Arg Lys
65 70 75 80

Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly Arg
85 90 95

Thr Thr Cys Thr Lys Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His
100 105 110

Glu Gln Pro His Leu Lys Arg Lys Ala Phe Cys Ser Phe Gln Ile Tyr
115 120 125

Thr Val Pro Trp Gln Gly Thr Met Thr Leu Ser Lys Ser Thr Cys Gln
130 135 140

Asp Ala
145

REIVINDICACIONES

1. Un homólogo de Cistatina C, para inhibir la actividad biológica de la unión de TGF- β con su receptor, en el que el homólogo de Cistatina C comprende:
 - un fragmento de secuencia de aminoácidos que comprende al menos los últimos 45 aminoácidos C-terminales de la SEQ ID NO: 2 y en el que al menos 30 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2 están deletados; o
 - una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 2 por la delección de restos de aminoácido desde aproximadamente la posición 80 hasta aproximadamente la posición 93, en el que la delección es suficiente para reducir o eliminar la actividad biológica del motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado de Cistatina C.
2. Un homólogo de Cistatina C de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:
 - a. un fragmento que comprende al menos aproximadamente 100 aminoácidos de la parte C-terminal de la SEQ ID NO: 2;
 - b. un fragmento que comprende al menos aproximadamente 75 aminoácidos de la parte C-terminal de la SEQ ID NO: 2;
 - c. un fragmento que comprende al menos aproximadamente 55 aminoácidos de la parte C-terminal de la SEQ ID NO: 2;
 - d. un fragmento que difiere de la SEQ ID NO: 2 por una delección de al menos aproximadamente 60 aminoácidos desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2; y
 - e. un fragmento que difiere de la SEQ ID NO: 2 por una delección de 50 aminoácidos desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2.
3. Un homólogo de Cistatina C de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el motivo inhibidor de cisteína proteinasa conservado está localizado entre aproximadamente la posición 80 y aproximadamente la posición 93 de la SEQ ID NO: 2.
4. Un homólogo de Cistatina C de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del homólogo de Cistatina C comprende una delección desde aproximadamente la posición 80 hasta aproximadamente la posición 93 de la SEQ ID NO: 2.
5. Un homólogo de Cistatina C de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para tratar a un paciente con cánceres de mama.

FIG. 1A

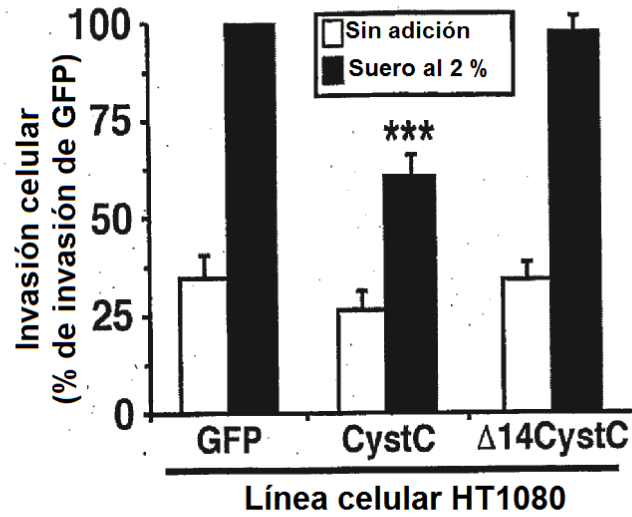


FIG. 1B

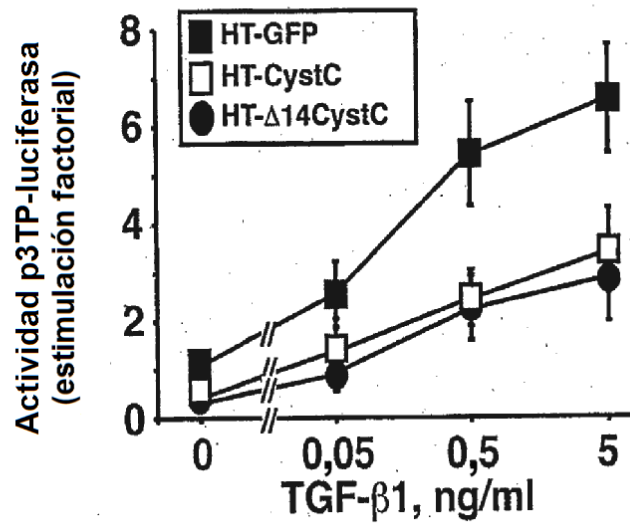


FIG. 2A

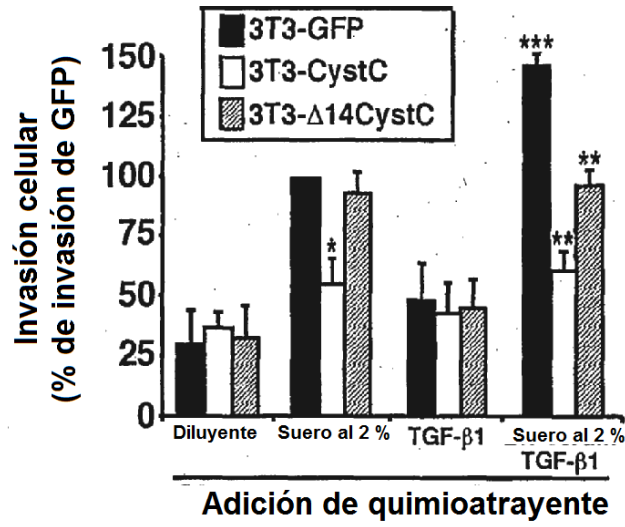


FIG. 2B

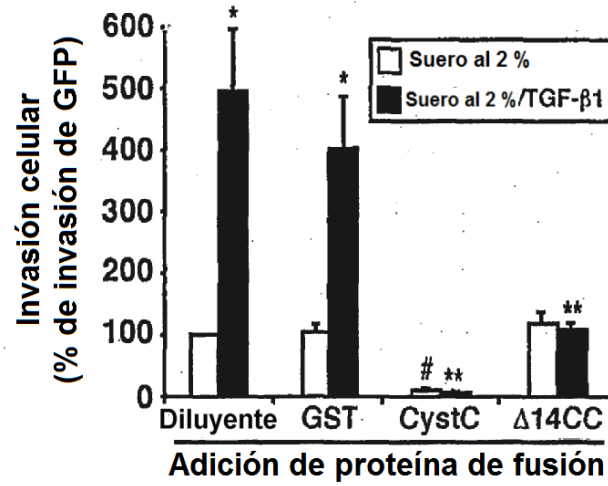


FIG. 3A

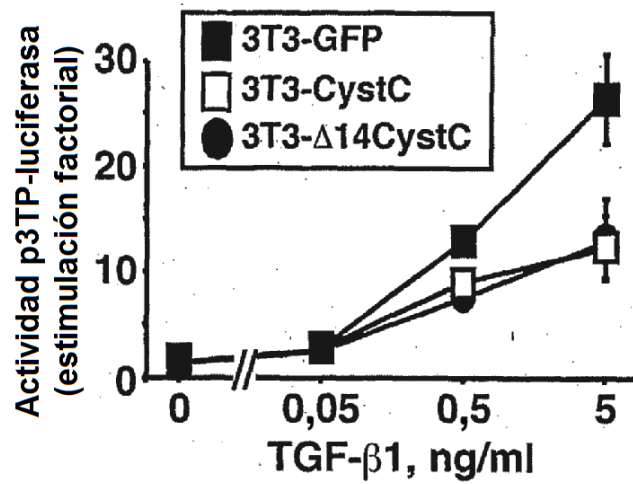


FIG. 3B

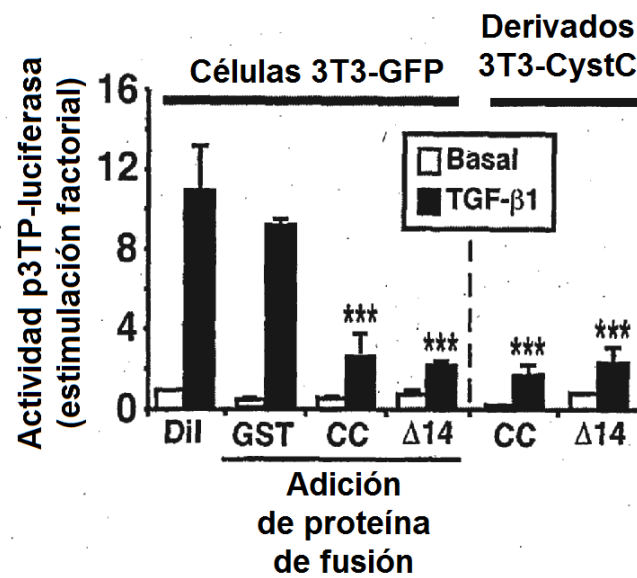


FIG. 4A

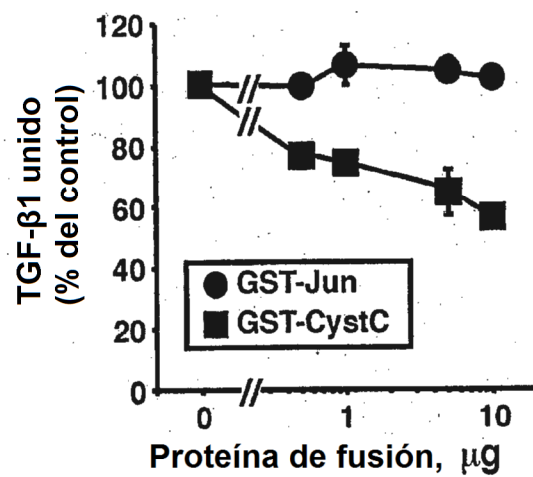


FIG. 4B

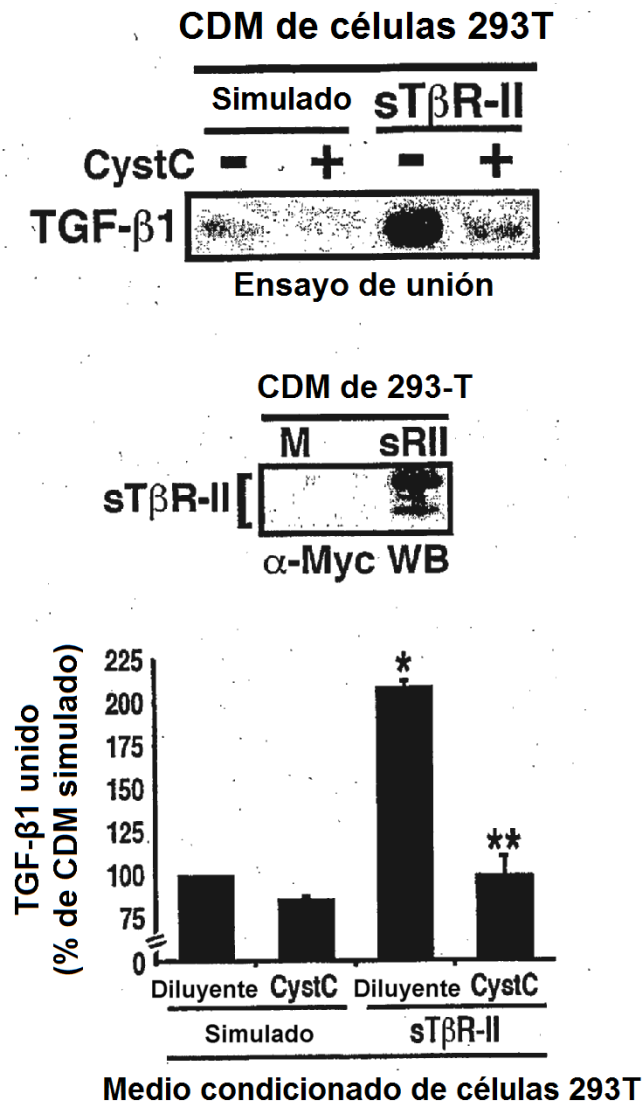


FIG. 5A

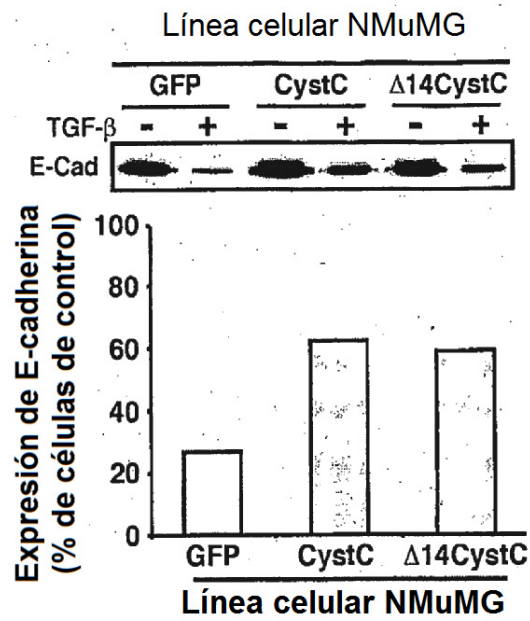


FIG. 5B

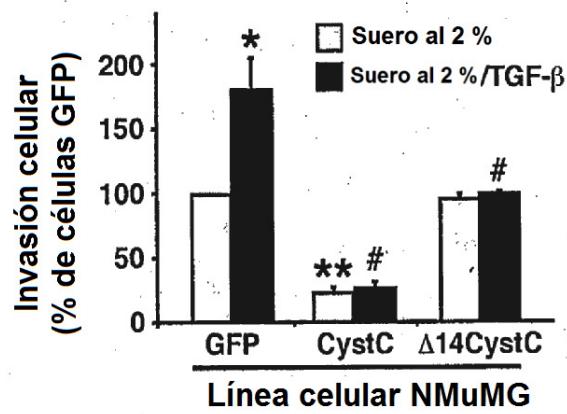


FIG. 6A

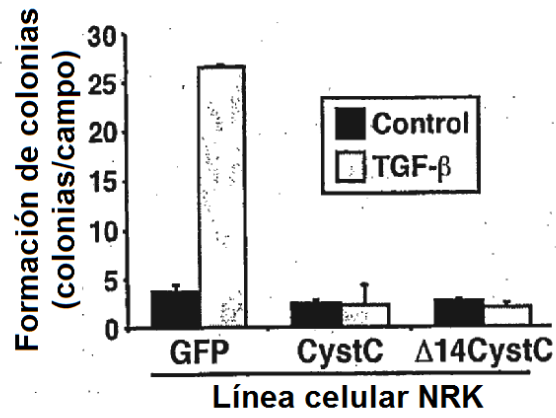


FIG. 6B

