

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 696**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
A61K 31/55	(2006.01)	A61P 35/02	(2006.01)
A61K 31/517	(2006.01)		
A61K 31/166	(2006.01)		
A61K 31/192	(2006.01)		
A61K 31/277	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
C12Q 1/48	(2006.01)		
G01N 33/50	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2001 E 06077137 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1782800**

54 Título: **Métodos para detectar inhibidores de JAK3**

30 Prioridad:

24.01.2000 US 177872 P
28.11.2000 US 723490

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2014

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
GENZYME CENTER 500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

VASIOS, GEORGE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 452 696 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

Métodos para detectar inhibidores de JAK3

Referencia cruzada con la Solicitud Relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/177.872, presentada el 24 de enero de 2000.

Campo de la invención

La presente invención se encuentra en el campo de la biología molecular y la ortopedia. La presente invención se dirige a métodos para detectar compuestos que inhiben JAK3 útiles para el tratamiento de la osteoartritis o de enfermedades o trastornos que implican una degradación del cartílago, tal y como se especifica en las reivindicaciones. La presente descripción se dirige a nuevos métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por JAK/STAT, particularmente enfermedades o trastornos mediados por JAK3 empleando inhibidores de JAK3.

Antecedentes de la invención

Biología de la enfermedad articular degenerativa

El cartílago articular cubre los extremos de los huesos largos dentro de las articulaciones sinoviales para proteger el hueso subyacente contra un cizallamiento normal y fuerzas de compresión que acompañan el soporte del cuerpo y el movimiento. El cartílago se compone de un colágeno de matriz extracelular. Dentro de la matriz de colágeno están contenidos los condrocitos (es decir, células especializadas del cartílago) y la sustancia fundamental. La sustancia fundamental está compuesta por proteoglicanos y agua. El colágeno forma la matriz que imparte resistencia a la tracción, mientras que los proteoglicanos forman grandes agregados que proporcionan resistencia a la compresión (Stockwell, 1991). Los proteoglicanos son moléculas grandes, hidrófilas fuertemente negativas, que atraen el agua. A presión normal de la función articular, el agua se exprime desde el cartílago para lubricar la superficie de la articulación. Una vez que se alivia la presión, el agua es absorbida por los proteoglicanos del cartílago. El movimiento del agua también proporciona el transporte de nutrientes y de productos de desecho desde y hacia los condrocitos: no hay riego sanguíneo en el tejido cartilaginoso. El mantenimiento de la integridad del cartílago es sumamente importante. Una carga anormal, ya sea por aumento o disminución, afecta a la integridad física del cartílago, influye sobre el metabolismo celular e induce cambios bioquímicos, todos ellos pueden conducir a una degradación del cartílago y al desarrollo de una enfermedad articular degenerativa, como la osteoartritis (OA) (Mow et al., 1992).

Una enfermedad articular degenerativa, como la OA se presenta de forma extensa en los vertebrados. Se caracteriza como una enfermedad progresiva, irreversible (Mankin y Brandt, 1991) que se produce por la degradación del cartílago. Aunque el nombre de osteoartritis sugiere una enfermedad o trastorno inflamatorio, la OA surge de procesos bioquímicos dentro de cartílago que conducen a una degradación del cartílago. En este sentido, la OA se distingue de la artritis reumatoide (AR) y de las espondiloartropatías seronegativas. A diferencia de la AR, en la que la membrana sinovial es la fuente primaria de enzimas degradativas, en la OA, los condrocitos son la fuente principal de enzimas responsables del catabolismo del cartílago. Sin embargo, respuestas inflamatorias ocasionales y transitorias, son frecuentemente una complicación secundaria distinta, asociada a la progresión de la OA (Goldring, 1999).

Aunque el acontecimiento(s) iniciador del desarrollo de la OA es aún desconocido, la patogénesis de la OA implica probablemente una interacción de factores mecánicos extrínsecos y el metabolismo intrínseco del cartílago. Las causas básicas de la OA pueden variar desde un trauma físico del cartílago (OA secundaria) a cambios metabólicos que afectan a los procesos normales de mantenimiento del cartílago, a reacciones inflamatorias intermitentes de bajo grado, a trastornos genéticos, en donde todas ellas pueden inducir enzimas autolíticas (Wilson, 1988, Goldring, 1999). Independientemente del suceso iniciador o del trauma que puede desencadenar la aparición de la OA, el modelo aceptado generalmente es que citocinas y/o receptores activados dan como resultado una transducción de señales al núcleo de los condrocitos, induciendo la expresión génica de enzimas que degradan el cartílago y de agentes inflamatorios.

Una lesión directa del cartílago también puede causar lesiones en los condrocitos. Los condrocitos pueden responder a la lesión produciendo enzimas de degradación e induciendo procesos de reparación inapropiados (Mow, et al., 1992). Los cambios bioquímicos en la OA afectan a diversos componentes del cartílago, incluyendo los agregados de proteoglicanos y colágenos. Los productos de la degradación de proteoglicanos se han identificado en el líquido sinovial de pacientes con OA (Lohmander et al., 1993). La disminución del contenido en proteoglicanos junto con un colágeno degradado conduce a una pérdida funcional de las propiedades fisiológicas normales de la matriz.

La descomposición enzimática de la matriz cartilaginosa es un factor clave en la aparición de la enfermedad articular degenerativa y su progresión (Pelletier et al., 1992; Pelletier et al., 1993). Las enzimas que degradan el cartílago conocidas por tener un papel principal en la patología de la OA, incluyen metaloproteasas de la matriz (MMPs), agreganasas y serina y tiol proteasas (Pelletier et al., 1997).

Las metaloproteasas de la matriz que participan en la OA incluyen colagenasas, estromelinas y gelatinasas. Las colagenasas son responsables de la degradación del entramado del colágeno de tipo II en el cartílago. La colagenasa-1 (MMP-1) y la colagenasa-3 (MMP-13) han sido identificadas *in situ* en el cartílago de OA. Los niveles de colagenasa-1 y colagenasa-3 se correlacionan con la gravedad histológica del cartílago afectado por OA (Reboul et al., 1996). Las estromelinas y las gelatinasas (que incluyen la gelatinasa-A y B, también conocidas como MMP-2 y MMP-9, respectivamente) son metaloproteoglicanasas que también están implicadas en la OA. Los niveles de estromelina también se correlacionan con la gravedad histológica de la OA (Dean et al., 1989). Además, la estromelina también se ha implicado en la activación de la procólagenasa, amplificando de este modo su efecto general en la patología de OA (Murphy et al., 1987). Se ha mostrado que la colagenasa de neutrófilos (también conocida como colagenasa-2, o MMP-8) escinde el agregano en sitios únicos, incluyendo el sitio de escisión de la agreganasa, aunque no lo suficiente como para ser considerada una agreganasa verdadera (Arner et al., 1997). Se cree que estas metaloproteinasas de la matriz son las principales responsables de las lesiones en los componentes de proteoglicano, colágeno II y colágeno IX del cartílago que se producen en la OA (Dean, et al., 1989; Mort, et al., 1993; Buttle, et al., 1993).

La(s) agreganasa(s) representa(n) una familia de enzimas que degradan el agregano, el componente principal de los agregados de proteoglicano en el cartílago. Las agreganasas se definen por su escisión característica del agregano entre Glu373-Ala374. Las agreganasas se han caracterizado recientemente como una subfamilia de la familia de las desintegrinas y las metaloproteasas (ADAM), que contiene múltiples motivos carboxi de trombospondina que son responsables de la unión a la matriz extracelular. Estos compuestos de desintegrina y metaloproteasa con motivo de trombospondina (ADAMTS), específicamente ADAMTS-4, ADAMTS-11 y posiblemente ADAMTS-1, poseen una actividad agreganasa característica específica de la escisión (Abbaszade et al., 1999; Tortorella et al., 1999).

El óxido nítrico (ON), un radical libre inorgánico, también se ha implicado en trastornos articulares degenerativos. El ON se sintetiza enzimáticamente a partir de 1-arginina mediante la sintasa de ON (siglas en inglés, NOS). Dos isoformas de NOS se conocen actualmente; NOS constitutiva (cNOS) y NOS inducible (iNOS). La medición clínica de los niveles de nitrito y nitrato del líquido sinovial de pacientes con OA, indica la producción de ON en las articulaciones con osteoartritis (Farrell et al., 1992). Además, se han descrito inhibidores de NOS para suprimir algunos daños artríticos en ratas (McCartney-Francis et al., 1993).

La ciclooxygenasa 2 (COX 2) desempeña un papel importante en la síntesis de eicosanoides, moléculas que actúan localmente de forma similar a las hormonas, que operan en una amplia variedad de procesos biológicos relacionados con el dolor, la fiebre y la inflamación. Específicamente, COX 2 es necesaria para la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, a partir de ácido araquidónico. NF- κ B (un heterodímero de p65 y p50) es un factor de transcripción que activa la transcripción de COX 2. Debido a que COX 2 se requiere en la síntesis de prostaglandinas, esta enzima y su factor de transcripción, NF- κ B también han sido objetivos como componentes clave en el inicio y la progresión de la OA.

El papel de las citocinas que regulan el metabolismo del tejido conjuntivo y sus vías concomitantes de transducción de señales intracelulares se ha estudiado ampliamente en relación con la degradación tisular asociada con enfermedades articulares tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis (véase, por ejemplo, Goldring, 1999; Pelletier et al., 1993). La investigación ha revelado que las citocinas inflamatorias tienen un papel central como señales bioquímicas que estimulan a los condrocitos para liberar diversos compuestos que degradan el cartílago mencionados anteriormente. Actualmente, se cree que las principales citocinas que están asociadas con una degradación del cartílago son la interleucina-1 y la interleucina-6 (IL-1 e IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

Se ha descrito que IL-1 y TNF- α incrementan la síntesis (es decir, la expresión génica) de proteasas, que incluyen las metaloproteasas. Inyecciones de IL-1 y TNF- α combinadas provocan una degradación del cartílago mayor que cualquier citocina aislada (Henderson y Pettipher, 1989; Page-Thomas, 1991). Además, se ha referido que la IL-1 muestra actividad autocrina en los condrocitos (Attur et al., 1998; Pelletier et al., 1993), produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva. IL-1 y TNF- α también inducen la expresión de IL-6 en fibroblastos sinoviales, implicando a IL-6 como una señal intermedia en la inducción de otras respuestas celulares (transcripción). Se ha encontrado que los niveles de IL-6 se correlacionan con niveles elevados de TNF- α , y están incrementados en los fluidos sinoviales procedentes de tejido con OA. Se ha mostrado que IL-1 desempeña un papel importante en la degradación del cartílago observada en la OA (Pelletier, et al., 1991; McDonnell, et al., 1992). Regula al alza la síntesis y la secreción de las metaloproteinasas estromelina y colagenasa intersticial, de una manera dependiente de la dosis (Stephenson, et al., 1987; Lefebvre, et al., 1990). Las células sinoviales similares a los macrófagos son consideradas por algunos como la principal fuente de IL-1 y otras citocinas que inducen a los condrocitos a expresar enzimas que degradan el cartílago. Los condrocitos mismos también se sabe que producen IL-1 (Goldring, 1999).

A pesar de los grandes esfuerzos investigativos detallados anteriormente, la manipulación de la(s) vía(s) intracelular(es) de transducción de señales de condrocitos con el fin de alterar el curso de la inducción mecánica y/o con citocinas de las enzimas de degradación del cartílago, sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar. La investigación actual se ha centrado en la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), que no se activa solamente mediante una amplia gama de estímulos, sino que también regula una variedad de factores de transcripción (especialmente la proteína-1 activadora o AP-1), sospechosa de ser responsable de la expresión de genes de MMP (por ejemplo, colagenasa-1 y colagenasa-3) y ciertas citocinas inflamatorias (Rutter et al., 1997; Pendas et al. 1997;

y Lee et al., 1994). Las cinasas de proteínas activadas por estrés (SAPKs, también conocidas como JNKs), las cinasas reguladas extracelularmente (ERKs) y las cinasas p38, se han considerado todas proteínas importantes en la vía de transducción de señales que conduce a la expresión de las enzimas que degradan el cartílago.

5 AP-1 es un complejo proteico heterólogo que incluye los polipéptidos c-Jun y c-Fos. La activación de AP-1 también se cree que tiene un papel importante en las enfermedades degenerativas progresivas del hueso y del cartílago (Firestein, 1996). Se cree que AP-1 regula los genes de la colagenasa y la estromelina (Matrisian, 1994), y la IL-1 está entre los inductores más potentes de la colagenasa y AP-1 en sinoviocitos similares a fibroblastos en la AR (Zuoning et al. 1999).

Tratamiento de la Enfermedad Articular Degenerativa

10 Metodologías actuales para el desarrollo de agentes terapéuticos para enfermedades articulares degenerativas como la OA, incluyen la síntesis de inhibidores de enzimas que degradan el cartílago, la regulación de los niveles de citocina/receptor celular y la regulación de las proteínas cinasas en general. Por ejemplo, se ha informado de que algunos inhibidores de la proteína cinasa C se pueden utilizar para aliviar, entre otras, la inflamación mediada por PKC en general (Nambi y Patil, 1993; Nambi y Patil, 1997). Algunos de estos inhibidores, que incluyen 4-(2-amino-4-oxo-2-imidazolin-5-iliden)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidropirroló (2,3-c) azepin-8-ona (himenialdisina; en lo sucesivo "H"), y 4-(2-amino-4-oxo-2-imidazolin-5-iliden)-4,5,6,7-tetrahidropirroló(2,3-c) azepin-8-ona (debromohimenialdisina; en lo sucesivo "DBH") y diversas sales fisiológicamente activas de las mismas, se han encontrado después que inhiben la degradación inducida con IL-1 del glicosaminoglicano y la matriz extracelular a través de condrocitos en cultivo y en explantes de cartílago articular (Chipman y Faulkner, 1997). Recientemente, los inhibidores de la tirosina cinasa, genisteína, herbimicina A, 4,5-dianilinoftalimida (DAPH), tirfostina AG 82 y tirfostina AG 556, también se ha observado que reducen o evitan la degradación del cartílago a través de condrocitos *in vitro* (Sharpe et al., 1997).

25 Sin embargo, muchos de los mecanismos celulares que regulan específicamente la expresión de enzimas que degradan el cartílago, implicadas en la enfermedad articular degenerativa, siguen siendo desconocidos. El descubrimiento de una vía de transducción de señales específica que regula las enzimas que degradan el cartílago, ya sea directamente o a través de intermediarios que la activan, representaría un gran avance en la comprensión de la inducción y la progresión de la enfermedad articular degenerativa y proporcionaría nuevas vías para el desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de tales enfermedades.

La vía Janus Cinasa (JAK)

30 Una vía de transducción de señales aislada y distinta, nunca antes asociada con ningún aspecto de la regulación de las enzimas que degradan el cartílago, ni con la vía de transducción de señales de IL-1, es la vía JAK/STAT. Una amplia variedad de citocinas polipeptídicas, linfocinas y factores de crecimiento activan (a través de receptores de citocinas) la familia JAK (revisada por Aringer et al., 1999). Asociaciones de JAK activadas por receptores promueven la activación (es decir, fosforilación de tirosina) de proteínas STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción). Las JAKs se cree que son las principales activadoras de las cinco proteínas STAT actualmente conocidas (Silvennoinen et al., 1997).

40 El modelo actual para la activación de STAT es que las JAKs fosforilan residuos de tirosina específicos en el receptor celular activado, creando sitios de anclaje para que los STATs se unan a sus dominios Src de homología 2 (SH2). Las JAKs catalizan la fosforilación de STAT, activando la dimerización de STAT y desacoplando los STATs del receptor. A continuación, dímeros de STAT se translocan al núcleo de la célula, en donde actúan como factores de transcripción, uniéndose, por ejemplo, a regiones promotoras de ADN del interferón (IRE y GAS) (Darnell Jr. et al., 1994; Ihle, 1995. Ihle, 1994. Darnell, 1997).

45 Aguas arriba, la activación de JAK está ligada directamente a receptores transmembranales celulares de citocinas que carecen de actividad cinasa intrínseca. Las JAKs son capaces de unirse a los motivos citoplasmáticos de estos receptores. Los receptores celulares actúan para reclutar/activar JAKs como su proteína cinasa no receptora, para dirigir la señalización intracelular (Aringer et al., 1999). Un modelo propone que la dimerización u oligomerización del receptor inducida por el ligando produce la agregación local de moléculas JAK y da como resultado la activación de JAK a través de un mecanismo de fosforilación cruzada (Taniguchi, 1995).

50 Los miembros de la familia JAK, que consisten actualmente en JAK1, JAK2, TYK2 y JAK3, son cinasas de tirosina no receptoras. Las proteínas JAKs contienen un dominio catalítico muy conservado, encontrado en otras tirosina cinasas (Firmbach-Kraft, 1990; Hanks et al., 1991; Hunter, 1991; Wilks, 1989)). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las otras tirosina cinasas, las JAKs se localizan en el citoplasma y contienen un segundo dominio de tipo cinasa de función desconocida, pero no contienen dominios SH2 o SH3, secuencias de péptido señal o dominios transmembranales (Harpur et al., 1992; Wilks et al., 1991).

55 Se conoce que las proteínas JAKs están implicadas en la señalización de una variedad de citocinas que actúan sobre las células hematopoyéticas. La transducción de la señal de JAK se activa mediante: IFN- α , IFN- β e IFN- γ (interferones); IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-17 (interleucinas); GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos); EPO (eritropoyetina); GH (hormone de crecimiento); CNTF (factor neurotrófico ciliar); LIF (factor inhibidor de la leucemia); OSM (oncostatina M); y PRL (prolactina) (Argetsinger, 1993; Gauzzi et al., 1996; Helden y

Purton (compiladores) 1996; Ihle, 1996; Liu et al., 1997; Luttichen, 1994; Muller et al., 1993; Schindler y Darnell Jr., 1995; Stahl et al., 1994. Subramaniam et al., 1999; Velazquez et al., 1992; Watling et al., 1993; Witthuhn et al., 1993; Rui et al., 1994.

5 Se ha mostrado una correlación absoluta entre la activación de JAK y la activación de varios acontecimientos de señalización aguas abajo, inducida por citocinas. Estos incluyen; fosfoinositol 3-cinasa (PI-3K), Shc, sustrato receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2), así como la fosforilación de Vav y la inducción de los genes de c-Myc, c-Fos, c-Jun, Pim y CIS (Silvennoinen et al., 1997).

10 Se ha encontrado que las proteínas JAK/STAT están presentes y se modulan *in vivo* en el cerebro embrionario y posnatal, lo que indica una función durante el desarrollo del cerebro (De-Fraja et al., 1998). La vía de JAK/STAT se ha observado que es importante en los tumores cerebrales (por ejemplo, meningiomas). Y la vía de JAK/STAT también se ha encontrado que sirve como una vía de transducción de señales en la patogénesis de la nefropatía diabética.

Janus Cinasa 3 (JAK3)

15 JAK3 es el miembro más reciente de la familia de proteínas tirosina cinasas de JAK. Se han descrito tres variantes por corte y empalme de JAK3 en células cancerosas hematopoyéticas y epiteliales. Las variantes por corte y empalme de JAK3 contienen regiones amino-terminales idénticas pero difieren en el extremo C-terminal (Lai et al., 1995; Gumiak y Berg, 1996). La importancia funcional de estas variantes por corte y empalme no se ha entendido totalmente. Se ha observado que los dominios amino terminales JH 7-6 (aminoácidos 1-192) de JAK3 son necesarios y suficientes para su interacción con la subunidad γ c de IL-2R (Chen et al., 1997).

20 La vía de transducción de señales JAK/STAT y, en particular, el papel de JAK3, representa un punto importante para la intervención terapéutica en diversas enfermedades y trastornos. Sin embargo, el alcance total y la función de la vía JAK/STAT siguen estando poco claros. Existe una necesidad en la técnica de entender la vía JAK/STAT más a fondo, y métodos para la regulación de esta ruta de transducción de señales proporcionarán nuevos agentes terapéuticos importantes para el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por JAK/STAT.

25 El documento WO 99/65909 describe compuestos de pirrolo[2,3-d]pirimidina que pretenden ser inhibidores de proteínas tirosina cinasas, tales como Janus Cinasa 3.

El documento US 5.914.393 pretende describir una cinasa Jak2 humana, aislada a partir de placenta humana y el uso de la proteína y su secuencia de ácido nucleico en el diagnóstico, estudio, prevención y tratamiento de una enfermedad.

30 **Compendio de la Invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la vía de transducción de señales JAK/STAT y, específicamente la JAK3, está implicada en la iniciación y la progresión de la enfermedad articular degenerativa. Específicamente, se ha mostrado que inhibidores de JAK3 bloquean la expresión inducida con IL-1 de genes que se sabe que están involucrados en el desarrollo y la progresión de la OA. También se demuestra en esta memoria por primera vez que JAK3 se expresa en condrocitos en al menos dos formas. Se presenta una evidencia que demuestra que moléculas tales como DBH y H, las cuales se han mostrado eficaces en el tratamiento de trastornos de degradación del cartílago, tales como la OA, en modelos animales, actúan como inhibidores específicos de JAK3, lo que reduce o suprime, directa y/o indirectamente, la expresión de diversos factores que degradan el cartílago y son mediadores en la inflamación. Finalmente, se proporciona una evidencia que demuestra que otros inhibidores de JAK3 también pueden suprimir eficazmente, de forma directa y/o indirecta, la expresión de diversos factores que degradan el cartílago de una manera idéntica a la de DBH y H. La identificación de esta nueva función de la vía JAK/STAT en la degeneración del cartílago y la identificación y la determinación de la función específica de los inhibidores de JAK3 en la prevención de la patología de estas enfermedades, proporcionan nuevas vías para el desarrollo de una clase de agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de la enfermedad articular degenerativa. También aclara nuevos usos para moléculas conocidas anteriormente como agentes terapéuticos para la OA, es decir, en el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por JAK/STAT distintos de la OA.

En un aspecto, la descripción se dirige al uso de un inhibidor de JAK/STAT para tratar una enfermedad o un trastorno que implica la degradación del cartílago.

50 En un aspecto relacionado, la descripción se dirige al uso de un inhibidor de JAK/STAT para regular la expresión de una enzima que degrada el cartílago.

En otros aspectos, la descripción incluye métodos para regular la expresión de agentes proinflamatorios en un condrocito, que incluyen iNOS, COX-2 o NF- κ B, poniendo en contacto el condrocito con un inhibidor de JAK/STAT.

55 En todavía otro aspecto, la presente descripción se dirige a métodos para regular la expresión de una citocina proinflamatoria en un condrocito, que incluye IL-6, TNF- α e IL-1, poniendo en contacto el condrocito con un inhibidor de JAK/STAT.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere en general a un método para tratar una enfermedad o un trastorno mediado por JAK/STAT, distinto de OA o un trastorno inflamatorio relacionado, como la inflamación mediada por PKC, mediante la administración de DBH o H.

- 5 Otra realización de la descripción incluye ensayos que implican interacciones de JAK3. Una realización incluye un ensayo para la detección de compuestos útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que implica una degradación del cartílago, mediante la detección de compuestos capaces de inhibir JAK3, y los compuestos descubiertos utilizando este ensayo.

En una realización, la presente invención se dirige a un método *in vitro* según se reivindica en la reivindicación 1.

En otra realización, la presente invención se dirige a un método *in vitro* según se reivindica en la reivindicación 5.

- 10 En una realización adicional, la presente invención se dirige a un método celular o tisular *in vivo* para detectar compuestos que inhiben JAK3 en animales no humanos, útil para tratar la osteoartritis, en donde el método comprende:

(a) poner en contacto JAK3 con un compuesto candidato, y

(b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.

- 15 En una realización adicional, la presente invención se dirige a un método celular o tisular *in vivo* para detectar compuestos que inhiben JAK3 en animales no humanos, útil para tratar una enfermedad o trastorno que implica una degradación del cartílago, en donde el método comprende:

(a) poner en contacto los condrocitos con un compuesto candidato, y

(b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La FIG. 1 proporciona una comparación de la secuencia parcial de ADNc de JAK3 obtenida a partir del análisis con RT-PCR de condrocitos humanos en cultivo, con el ADNc publicado de JAK3 humana (nº de orden de GenBank U09607).

La FIG. 2 proporciona una comparación de la secuencia parcial de ADNc de JAK3 obtenida a partir del análisis con RT-PCR del ARNm extraído directamente de una muestra de cartílago osteoartítico.

- 25 La FIG. 3 proporciona una comparación del ADNc humano de JAK3 (nº de orden de GenBank U09607) y del ADNc de JAK3 aislado a partir de una genoteca de ADNc de condrocitos humanos.

La FIG. 4 ilustra los resultados del análisis con transferencia Northern del ARNm de JAK3 en condrocitos articulares humanos normales.

La FIG. 5 ilustra la inhibición con DBH de JAK3, determinada por análisis con ELISA.

- 30 La FIG. 6 proporciona una comparación ilustrativa de la inhibición de JAK3 mediante H (979) y DBH (5025) determinada por análisis con ELISA.

La FIG. 7 proporciona una comparación ilustrativa de la inhibición del sustrato a través de diferentes formas de variantes de DBH determinada por análisis con ELISA. La FIG. 7A muestra las curvas de inhibición de dos formas de sales (DBH-2S y DBH-1) y una forma de base libre (DBH-2FB) de DBH. La FIG. 7B ilustra la inhibición comparativa con la base libre de DBH de ZAP-70, LCK, BTK, IGF y JAK3.

- 35 La FIG. 8 (A&B) ilustra los resultados del análisis con transferencia Northern de la inhibición con DBH de los ARNm de diversos componentes que degradan el cartílago en condrocitos articulares humanos.

La FIG. 9 representa gráficamente la inhibición de la actividad agreganasa inducida con IL-1 mediante diferentes formas de variantes de DBH.

- 40 FIG. 10 ilustra los resultados del análisis con transferencia Northern de la inhibición del ARNm de diversos componentes que degradan el cartílago con el inhibidor específico de JAK3, 4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (conocido en la técnica como WHI-P131, e identificado en la figura como J1030) en condrocitos articulares humanos.

Descripción detallada de la invención

- 45 En esta memoria se describe el primer informe que describe una función de los condrocitos en la transducción de señales JAK/STAT y su participación en la iniciación y la progresión de una enfermedad articular degenerativa. Específicamente, el inventor ha descubierto que DBH y H, conocidas actualmente como agentes terapéuticos eficaces en modelos animales de enfermedad articular degenerativa, tal como OA, actúan de hecho interrumpiendo la trans-

ducción de la señal JAK/STAT en los condrocitos, específicamente, actuando como inhibidores de JAK3. Para confirmar esta nueva función de la vía JAK/STAT en la enfermedad articular degenerativa, se presenta una evidencia que muestra que un inhibidor adicional de JAK3 conocido, del que se desconocía previamente que efectuaba una regulación de los factores de degradación del cartílago, también regula los procesos celulares de una manera idéntica a DBH y H.

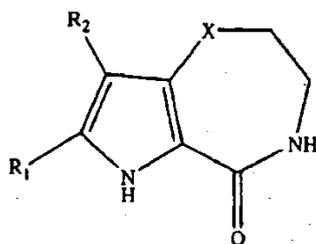
Como resultado de estos descubrimientos, se identifica una nueva clase de compuestos, es decir, inhibidores de JAK/STAT, y preferiblemente inhibidores de JAK3 distintos de DBH y H, por ser útiles para alterar el curso de enfermedades que implican la degeneración del cartílago. Por lo tanto, en un aspecto, la presente descripción se dirige a un método para inhibir la progresión o la probabilidad de desarrollar una enfermedad o un trastorno que implica la degradación del cartílago, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de JAK/STAT distinto de DBH o H. Tales enfermedades y trastornos incluyen OA, artritis reumatoide, así como OA generalizada primaria, OA aislada, OA secundaria, artritis traumática, poliartritis seronegativa, artritis reumatoide seronegativa y seropositiva, artritis seronegativa, artritis reumatoide juvenil y artritis psoriásica.

Tal y como se usa en este documento, un "inhibidor de JAK/STAT" se refiere a cualquier compuesto capaz de regular a la baja o disminuir o suprimir de otro modo la cantidad y/o la actividad de las interacciones de JAK-STAT. Los inhibidores de JAK regulan a la baja la cantidad o la actividad de moléculas JAK. Los inhibidores STAT regulan a la baja la cantidad o la actividad de moléculas STAT. La inhibición de estos componentes celulares puede lograrse mediante una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo la unión directa a JAK (por ejemplo, un complejo que se une a un compuesto inhibidor de JAK, o un sustrato mimético), la unión directa a STAT o la inhibición de la expresión del gen que codifica los componentes celulares. El inhibidor preferido de JAK/STAT de la presente descripción es un inhibidor de JAK, y lo más preferido es un inhibidor de JAK3. En general, los inhibidores de JAK/STAT pueden ser proteínas, polipéptidos, moléculas pequeñas y otros restos químicos, o ácidos nucleicos.

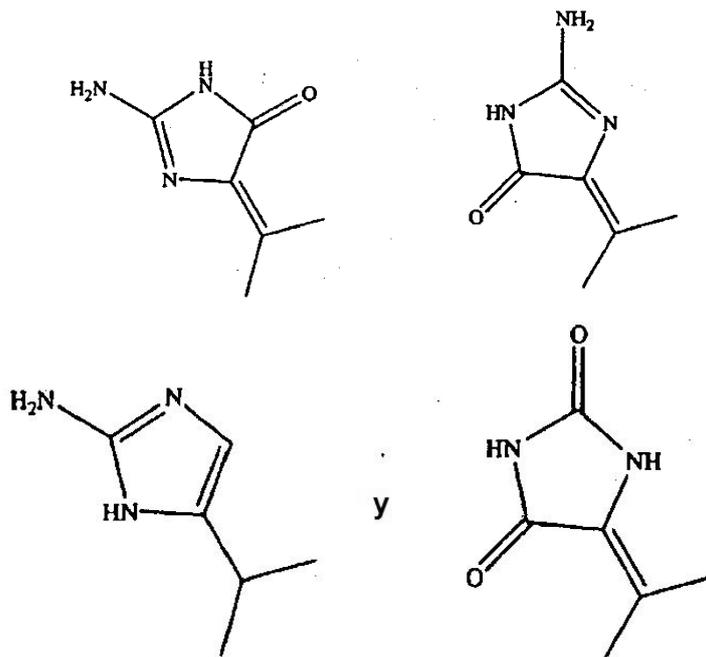
Mutantes, variantes, derivados y análogos de los inhibidores mencionados anteriormente también pueden ser útiles en los métodos de esta descripción. Tal y como se usa en esta memoria, "mutantes, variantes, derivados y análogos" se refieren a moléculas con forma o estructura similar a la del compuesto original y que conservan la capacidad de actuar como inhibidores de JAK/STAT. Por ejemplo, cualquiera de los inhibidores de JAK3 descritos en este documento se puede cristalizar, y análogos útiles se pueden diseñar racionalmente basándose en las coordenadas responsables de la forma del(de los) sitio(s) activo(s). Alternativamente, el experto ordinario en la técnica puede modificar sin una experimentación indebida, los grupos funcionales de un inhibidor conocido y escrutar tales moléculas modificadas para aumentar la actividad, la semivida, la biodisponibilidad u otras características deseables. Cuando el inhibidor de JAK/STAT es un polipéptido, se pueden producir fragmentos y modificaciones del polipéptido para aumentar la eficacia de la administración, la actividad, la semivida, etc. Una vez más, dado el nivel de capacidad en la técnica para la producción de polipéptidos sintéticos y recombinantes, tales modificaciones pueden lograrse sin una experimentación indebida.

Ejemplos de inhibidores de JAK/STAT que pueden ser útiles en los métodos de esta descripción incluyen: proteínas PIAS, que se unen e inhiben a nivel de las proteínas STAT (Chung et al., 1997); miembros de una familia de proteínas que contiene SH2 que son capaces de unirse a JAKs y/o a receptores y bloquean la señalización (véase, por ejemplo, Aman y Leonard, 1997; Nicholson y Hilton, 1998); proteína inducible con citocinas que contiene Src de homología 2 (CIS), un inhibidor de la señalización de STAT (Yoshimura et al., 1995); proteínas relacionados con CIS que pueden inhibir la señalización de STAT o unirse directamente a Janus cinasas (Yoshimura et al., 1995; Matsumoto et al., 1997; Starr et al., 1997; Endo et al., 1997; Naka et al., 1997); un supresor de la proteína de señalización I de citocinas (SOCS-1, también denominada JAB o SSI-1), que parece asociarse con todas las JAKs para bloquear la activación aguas abajo de STAT3 (Ohya et al., 1997); tirfostinas que son derivados de malononitrilo de bencilideno, que se asemejan a restos de tirosina y erbstatina (Gazit et al., 1989); AG-490, un miembro de la familia tirofostina de inhibidores de tirosina cinasa (Wang et al 1999, también Kirken et al., 1999); ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzoico y 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzamida, que inhiben específicamente JAK3 (Goodman et al. 1998); 4-(fenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (compuesto original WHI-258) y derivados de este compuesto que se obtienen estructuralmente a partir de compuestos de dimetoxiquinazolina (Sudbeck et al., 1999); compuestos que contienen un grupo 4'-OH, que incluyen 4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (WHI-P131), 4-(3'-bromo-4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (WHI-P154) y 4-(3',5'-dibromo-4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (WHI-P97); WHI-P180, otro compuesto de dimetoxiquinazolina (Chen et al., 1999); y agentes que elevan el AMPc, tales como forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa y dibutilil AMPc, y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc (Kolenko et al., 1999).

Tal y como se usa en este documento, "DBH" y "H" se refieren a debromohimendialdisina e himendialdisina, respectivamente, así como a diversos análogos y sales fisiológicamente activas de las mismas, que incluyen DBH en forma de base libre y formas de ácido trifluoroacético y ácido metanosulfónico de DBH. Los análogos de DBH y H incluyen compuestos que contienen un anillo heterocíclico de cinco miembros, que contiene nitrógeno, unido a la posición cuatro del anillo de pirroloazepina encontrado en DBH. Ejemplos de análogos incluyen himenina y axinohidantoína. Específicamente, los análogos de DBH y H contienen la estructura:



en donde R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en -H y un halógeno y X se selecciona a partir del grupo que consiste en:



5

según se determina en Chipman y Faulkner (1997; en donde cada una de las estructuras químicas anteriores con grupos radicales X incluyen la representación del enlace químico con la posición cuatro del anillo de pirroloazepina encontrado en DBH).

10 Tal y como se usa en este documento, una "cantidad farmacéuticamente eficaz" de un inhibidor de JAK/STAT es una cantidad eficaz para lograr el resultado fisiológico deseado, ya sea en las células tratadas *in vitro* o en un sujeto tratado *in vivo*. Específicamente, una cantidad farmacéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para inhibir, durante algún periodo de tiempo, uno o varios de los procesos patológicos clínicamente definidos, asociados con el estado de la enfermedad en cuestión. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del inhibidor de JAK/STAT específico seleccionado, y también depende de una variedad de factores y condiciones relacionados con el sujeto que se va a tratar y con la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el inhibidor se va a administrar *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de respuesta a la dosis y los datos de la toxicidad obtenidos en un trabajo preclínico de los animales, estarían entre los considerados. Si el inhibidor se va a poner en contacto con las células *in vitro*, también se diseñará una variedad de estudios preclínicos *in vitro* para evaluar parámetros tales como la absorción, la semivida, la dosis, la toxicidad, etc. La determinación de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente dado está claramente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

25 Los métodos de la presente descripción también incluyen la regulación de la expresión de una enzima que degrada el cartílago en una célula, poniendo en contacto la célula con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de JAK/STAT distinto de DBH o H. Las enzimas que degradan el cartílago incluyen metaloproteasas de la matriz, agrecanasas y proteasas de serina y tiol. Las metaloproteasas de la matriz preferidas incluyen estromelinas (por ejemplo, estromelina-1), gelatinasa A, gelatinasa B, colagenasa 1, colagenasa 3 y colagenasa de neutrófilos. Las agrecanasas preferidas incluyen ADAMTS-1, ADAMTS-4 y ADAMTS-11. Las células susceptibles a este tratamiento incluyen cualquier célula que expresa tales enzimas que degradan el cartílago, incluyendo condrocitos y sinoviocitos.

30 Tal y como se usa en este documento, la expresión "regulación de la expresión" y/o de la actividad generalmente se refiere a cualquier proceso que funciona para controlar o modular la cantidad o la actividad (funcionalidad) de un componente celular. La regulación estática conserva la expresión y/o la actividad a un nivel dado. La regulación por incremento se refiere a un aumento relativo de la expresión y/o la actividad. La regulación a la baja es una disminución relativa de la expresión y/o la actividad. En la presente descripción, la regulación es preferiblemente la regula-

ción a la baja de un componente celular. Tal como se utiliza en la presente memoria, la regulación a la baja es sinónimo de inhibición de un componente celular dado.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan métodos para regular la expresión de agentes pro-inflamatorios en un condrocito, que incluyen iNOS, COX-2 o NF- κ B, poniendo en contacto el condrocito con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de JAK/STAT distinto de DBH o H.

En otro aspecto de la presente descripción, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de JAK/STAT distinto de DBH o H se utiliza para regular la expresión de una citocina proinflamatoria en un condrocito, incluyendo IL-6, TNF- α e IL-1.

En aspectos adicionales, los métodos anteriores se emplean para regular la expresión de enzimas que degradan el cartílago, agentes proinflamatorios y citocinas proinflamatorias en sinoviocitos.

También, como resultado de estos descubrimientos, se ha identificado una nueva clase de inhibidores de JAK-3, es decir, DBH y H. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por JAK-STAT que no sea la inflamación mediada por OA o PKC, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de DBH o H. Las enfermedades o trastornos mediados por JAK/STAT son aquellos en los que la vía de señalización JAK/STAT participa en la mediación de uno o varios de los síntomas o causas del estado de enfermedad, definidos clínicamente. Ejemplos de tales enfermedades y trastornos incluyen: trastornos mediados por linfocitos T tales como HTLV-1, síndrome de Sdzory, transformación c-abl, linfomas de linfocitos T de tipo citolíticos naturales (tumores de tipo NK) y enfermedad de injerto contra hospedador; enfermedades o trastornos de Tipo 2 (hipersensibilidad frente a citocinas) como leishmaniosis, lepra, alergia e infecciones víricas; trastornos mediados por células cebadas, tales como alergias, fiebre del heno, asma, urticaria y anafilaxis; y leucemias y linfomas que incluyen leucemias linfocíticas agudas y leucemias linfoblásticas, linfomas y leucemias de origen mieloide de linfocitos B.

Por ejemplo, se ha observado que JAK3 se asocia específicamente con la familia de receptores de citocinas con cadena gamma común (γ c), por ejemplo, los de las interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 y IL-15 y tal vez IL-13 también (Rolling et al., 1996; Yu et al., 1998; Keegan et al., 1995; Izuhara et al., 1996). Por lo tanto, cualquier estado patológico en el que la interrupción de esa asociación pueda ser beneficiosa, es susceptible de tratamiento con DBH y H.

JAK3 se distingue de otros miembros de la familia JAK por la regulación al alza significativa de la expresión después de una activación linfoide (linfocitos T, linfocitos B), o mieloide (por ejemplo, monocitos) o una diferenciación celular, lo que es indicativo de una función significativa en la inmunorregulación (Kawamura et al., 1994, Kumar et al., 1996, Tortolani et al., 1995, Musso et al., 1995). Por lo tanto, DBH y H se describen en esta memoria por ser útiles en el tratamiento de afecciones inflamatorias que no sean la inflamación mediada por PKC.

Por otra parte, una mutación activadora de JAK de *Drosophila* causa leucemia en la mosca, y una mutación negativa dominante de la proteína STAT asociada, inhibe la proliferación de las células de leucemia (Hou et al., 1996; Luo et al., 1995). Una variedad de otros estudios han implicado que la hiperactivación de JAK tiene un papel en el cáncer, incluyendo la transformación de HTLV-I (Migon et al., 1995), el síndrome de Sdzary (Zhang et al., 1996), la transformación v-abl (Danial et al., 1995) y diversas formas de leucemia. Específicamente, JAK-3 se expresa en numerosas líneas celulares obtenidas a partir de leucemia que incluyen; AMLs (KG1, TF-1, HEL), la línea B ALLs (PB697, Nalm-16 y Nalm-6) y T-ALLs (Molt-16 y Molt-3). (Civin et al., 1998 y 1999) y se expresa copiosamente en células leucémicas primarias procedentes de niños con leucemia linfoblástica aguda, el tipo más común de cáncer infantil (p. ej., Sudbeck et al., 1999). Por lo tanto, DBH y H pueden ser útiles como agentes terapéuticos en cánceres en los que JAK-3 desempeña un papel en la iniciación o la progresión de la tumorigénesis.

JAK3 también se sabe que desempeña un papel, por ejemplo, en la transcripción de *c-jun* inducida por radiación (Goodman et al., 1998). Además, los inhibidores de JAK3/STAT6 pueden tener un papel clave en el tratamiento de diversos estados de enfermedad de tipo 2, tales como la leishmaniosis, la lepra, la alergia y la infección vírica (Wang et al. 1999).

Recientemente, Malaviya y Uckun (1999) han informado de que JAK3 se expresa en mastocitos y que su actividad enzimática se ve reforzada por la reticulación del receptor de IgE/Fc ϵ RI. Estos resultados sugieren que JAK3 desempeña un papel fundamental en las respuestas de los mastocitos mediadas por receptor de IgE-FcRI, tanto *in vitro* como *in vivo* y puede tener funciones esenciales no redundantes para la capacidad de señalización total del receptor de IgE de alta afinidad en los mastocitos, lo que está implicado en estados de enfermedad tales como el asma y la anafilaxis.

Cualquiera de los procesos anteriores se puede modular poniendo en contacto las células diana u órganos con una cantidad farmacéuticamente eficaz de DBH o H.

Las vías de administración de un inhibidor de JAK/STAT a un sujeto no están limitadas y pueden incluir la vía parenteral (incluyendo la inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica u oral. Por ejemplo, el inhibidor de JAK/STAT se puede administrar por vía intraarticular en una región localizada afectada (por ejemplo, una articulación) del sujeto, maximizando así el efecto terapéutico

en esa región, mientras que se minimizan los efectos en regiones no afectadas. El inhibidor también se puede administrar por vía tópica, cerca de la región afectada. Alternativamente, el inhibidor se puede administrar por vía oral, por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos.

5 El inhibidor de JAK/STAT se puede administrar a un sujeto en una dosis única o en administraciones repetidas y en cualquiera de una variedad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica. Las formas de sales fisiológicamente aceptables y las técnicas convencionales de formulación farmacéutica son bien conocidas por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.).

10 Debido a que la presente descripción describe por primera vez el papel funcional de la vía JAK/STAT en condrocitos, en la aparición y progresión de enfermedades o trastornos con degradación del cartílago, la presente invención se dirige a un método para la detección de nuevos compuestos útiles para el tratamiento de tales enfermedades o trastornos, tal como se especifica en las reivindicaciones.

15 Los métodos de la presente invención identifican compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos por degradación del cartílago, que se llevan a cabo mediante el escrutinio de un compuesto candidato, o de una genoteca de compuestos candidatos, para estudiar su capacidad para inhibir la actividad de JAK3. Una variedad de protocolos de ensayo y de técnicas de detección son bien conocidos en la técnica y un experto en la materia los adapta fácilmente para este fin. Tales ensayos incluyen ensayos de alto rendimiento, ensayos celulares y tisulares *in vitro* e *in vivo*.

20 Habiendo descrito ahora con detalle la presente invención, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo a efectos de ilustración.

EJEMPLO 1: Preparación de cultivos de condrocitos articulares humanos

Para el estudio de la patología celular asociada con enfermedades o trastornos degenerativos del cartílago tal como la OA, se prepararon cultivos de células de cartílago humano (condrocitos humanos).

25 Cortes normales de cartílago articular humano se obtuvieron a partir de la rodilla de un hombre de raza caucásica de 30 años de edad, 48 horas después de la autopsia (National Disease Research Interchange (NDRI), Philadelphia, PA). Condrocitos articulares fueron liberados de los cortes de cartílago troceados mediante digestión enzimática (0,1% de colagenasa de *Clostridium histolyticum*; Worthington, Freehold, NJ) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) a 37°C durante una noche. El material digerido de forma incompleta se digirió durante tres horas más, utilizando 0,25% de colagenasa y 0,05% de tripsina en DMEM.

30 Los condrocitos se sembraron sobre plástico en monocapas, y se cultivaron hasta confluencia en presencia de DMEM, suero bovino fetal al 10% (FBS; HyClone, Logan, UT), 100 U/ml de penicilina (pen) y 100 µg/ml de estreptomina (strep), a 37°C, 8% de CO₂, cambiando el medio cada tercer día. En fase de confluencia, los condrocitos del primer pase se recogieron mediante tripsinización, se marcaron como la cepa celular HC30-0198 y se almacenaron en nitrógeno líquido en presencia de DMEM, pen/strep, 40% de FBS y 10% de sulfóxido de dimetilo para uso futuro.

35 EJEMPLO 2: Expresión de JAK3 en condrocitos articulares humanos normales

Para demostrar la expresión de JAK3 en los condrocitos humanos, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) utilizando cebadores específicos de JAK3 sobre el ARN total aislado a partir de condrocitos humanos adultos normales, cultivados en monocapa.

40 Los condrocitos articulares adultos normales se aislaron a partir de cortes de cartílago y se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. La cepa celular HC30-0198 de condrocitos congelados se descongeló, se cultivó en monocapa (segundo pase) tal y como se ha descrito anteriormente y se cultivó hasta 5 días después de confluencia.

El ARN total se extrajo de los condrocitos articulares humanos confluentes después del 5º día utilizando el kit de Qiagen Rneasy® (QIAGEN, Valencia, CA), de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

45 Los cebadores de JAK3 fueron diseñados a partir del gen de JAK3 humano publicado y las secuencias de ADNc (nº de orden de GenBank U70065 y U09607, respectivamente). Tres cebadores de ADN específico del gen de JAK3 se dirigieron a los exones 18 y 19 del gen de JAK3 humano (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores de ADN de JAK3 humano.

Cebador	Región/Cadena	Secuencia
JK3-1	exón 18 (codificante)	5' GGT CAT GGA GTA CCT GCC 3'
JK3-2	exón 19 (no codificante)	5' GTT GTC CGA GAG GGA TTC GG 3'
JK3-3	exón 19 (no codificante)	5' GCG GAC CAC GTA GTA GTC 3'

El ADNc de la primera cadena se preparó usando el cebador JK3-2, ARN total y el método Ready-To-Go[®] You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

- 5 El producto de ADNc (8 µl) se amplificó en una reacción de 100 µl empleando: 10 µl de 10X tampón de PCR, 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de Taq polimerasa empleando un arranque en caliente (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 73 µl de agua y 3 µl de cada uno de los cebadores JK3-1 y JK3-3 10 µM. El protocolo de PCR de arranque en caliente consistía en una desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C (seguida por la adición de polimerasa Taq), seguida de: desnaturalización durante 30 s a 94°C; reasociación durante 30 s a 56°C; extensión durante 30 s a 72°C. La desnaturalización, la reasociación y la extensión se realizaron durante 40 ciclos, seguidas de una extensión final durante 5 min a 72°C.

La RT-PCR generó un producto de ADN de 254 pares de bases, que se purificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% de SeaKem[®] GTG[®] (FMC BioProducts, Rockland, ME) empleando el kit de extracción en gel de QIAquick[®] (QIAGEN, Valencia, CA).

- 15 El producto de la RT-PCR se secuenció utilizando el cebador JK3-3 y reactivos de secuenciación y el protocolo de AmpliCycle[®] (Perkin Elmer, Foster City, CA). Una secuencia de ADN de 109 nucleótidos se obtuvo a partir de la reacción de secuenciación cíclica de una cadena del producto de la RT-PCR, mostrando 106 nucleótidos una identidad del 100% con la secuencia de ADNc de JAK3 humana de GenBank (nº de orden U09607) (FIG. 1). Las discrepancias de tres nucleótidos se atribuyeron a la calidad subóptima del molde de la secuenciación generado por RT-PCR y del gel de secuenciación del ADN.

EJEMPLO 3: Expresión de JAK3 en condrocitos articulares procedentes de cartílago humano osteoartrotico

Para comparar la expresión de JAK3 en condrocitos procedentes de cartílago osteoartrotico humano, con la que se encontró en los condrocitos humanos normales del Ejemplo 2 anterior, se realizó una RT-PCR utilizando cebadores específicos de JAK3 sobre el ARN total aislado directamente a partir de cartílago osteoartrotico de adulto.

- 25 Los cortes de cartílago articular osteoartrotico procedentes de la rodilla derecha de una mejor de raza caucásica de 47 años de edad, que había padecido un reemplazo total de rodilla, se obtuvieron a partir del NDRI. El cartílago se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, inmediatamente después de la recogida. Un total de 2-4 gramos de cartílago intacto se pulverizaron en forma de polvo en presencia de nitrógeno líquido usando un molino SPEX (SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ). El ARN total se aisló a partir del cartílago pulverizado usando el método TRIsipin descrito por Reno et al. (1997).

La RT-PCR se realizó sobre la muestra de ARN total, usando los cebadores JK-1, JK-2 y JK-3 como se ha descrito en el Ejemplo 2. La RT-PCR generó un producto de ADN de 254 pares de bases, que posteriormente se purificó a partir de un gel de agarosa al 2% de SeaKem[®] GTG[®] (FMC BioProducts, Rockland, ME) empleando el kit de extracción en gel de QIAquick (QIAGEN, Valencia, CA).

- 35 El producto de la RT-PCR se secuenció utilizando el cebador JK3-3 y el kit "AB1 Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. La secuencia de ADN se determinó utilizando un secuenciador de ADN de ABI PRISM[®] 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se determinó una secuencia de 214 pb.

- 40 De los 214 nucleótidos secuenciados, 197 nucleótidos mostraron 100% de identidad con la secuencia de ADNc de JAK3 humana de GenBank (número de orden U09607) (FIG. 2). Las discrepancias restantes en 17 nucleótidos se atribuyeron a la calidad subóptima del molde de la secuenciación.

EJEMPLO 4: Aislamiento del ADNc de JAK3 a partir de una genoteca de ADNc de condrocitos humanos

Para demostrar adicionalmente que JAK3 se expresa activamente en condrocitos humanos, JAK3 se aisló a partir de una genoteca de ADNc de condrocitos humanos.

- 45 Empleando métodos conocidos en la técnica, el ARN total aislado a partir de condrocitos articulares humanos cultivados en alginato se empleó para generar una genoteca de ADNc (la construcción de la genoteca de ADNc fue

realizada comercialmente por Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca de ADNc se tituló y se escrutó siguiendo protocolos bien establecidos (Sambrook et al., 1989, y los protocolos recomendados por Stratagene, La Jolla, CA).

5 Una sonda de ADN de JAK3 se utilizó para escrutar la genoteca de ADNc de condrocitos. La prehibridación y la hibridación de los filtros de la genoteca de ADNc se realizaron usando una solución 1X de prehibridación/hibridación (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) a 65°C. Después de 15 horas de hibridación con la sonda de ADN de JAK3, la transferencia se lavó sucesivamente dos veces en 2X SSC/0,1% de SDS (15 minutos/lavado a temperatura ambiente), y dos veces en 1X SSC/0,1% de SDS (30 minutos/lavado a 65°C). La transferencia se dejó secar al aire, y las señales radiactivas se visualizaron utilizando una película autorradiográfica X-Omat® AR (XAR) de Kodak (Eastman Kodak, Rochester, NY).

10 Las placas que eran positivas en filtros por duplicado se recogieron, se colocaron en 1 ml de tampón SM estéril (Tris 0,05 M pH 7,5, NaCl 0,1 M, MgSO₄ 0,008 M, 0,01% de gelatina), se agitaron con vórtex y se incubaron a 4°C durante una noche. Catorce placas positivas procedentes del primer escrutinio, se volvieron a sembrar en placas utilizando 10 µl de una dilución 1 x 10⁻² in 200 µl de la cepa bacteriana XL-1 Blue MRF⁺ (Stratagene, La Jolla, CA), y se escrutaron con una sonda de ADN de JAK3 como anteriormente. Las placas positivas procedentes del segundo
15 escrutinio se recogieron y se extendieron en placas en tampón SM como anteriormente.

Dos clones de fagos positivos procedentes del segundo escrutinio se seleccionaron para un análisis de la secuencia de ADN basándose en; i) la confirmación de la identidad de JAK3 utilizando los cebadores JK3-1 y JK3-3 en una reacción de PCR tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, y ii) la identificación del tamaño del inserto de ADNc clonado empleando los cebadores de PCR T7 y T3 (Stratagene, La Jolla, CA). El protocolo de PCR de arranque en caliente consistía en una desnaturalización inicial durante 5 min a 93°C (seguida por la adición de Taq polimerasa), seguida de: desnaturalización durante 1 min a 93°C; reasociación durante 1 min a 55°C; extensión durante 45 s a 75°C. La desnaturalización, la reasociación y la extensión se realizaron durante 40 ciclos, seguidas de una extensión final durante 7 min a 75°C. El tamaño de los productos de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% de Sea-Kem® GTG® (FMC BioProducts, Rockland, ME).

25 Después de la identificación del producto de la PCR de los dos clones de fago lambda ZAP® II, que contenían los insertos de ADNc más grandes para JAK3, los insertos de ADNc de JAK3 se subclonaron cada uno en una cepa SOLR de *E. coli* usando el fago auxiliar ExAssist® Interference-Resistant (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se aislaron varias colonias bacterianas, y el ADN plasmídico se purificó a partir de estos clones utilizando un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA).

30 El análisis de la secuencia de ADN de una hebra de ADN de cada uno de los dos subclones, mostró que la secuencia de aproximadamente 2000 nucleótidos que se había obtenido a partir de cada subclon era idéntica a la secuencia publicada de ADNc de JAK3 (GenBank nº de orden U09607). La secuencia de ADN determinada a partir de uno de los subclones se proporciona como FIG. 3.

35 Los resultados de los Ejemplos 2, 3 y 4 confirman, por primera vez, la expresión de JAK3 en condrocitos articulares cultivados procedentes de cartílago humano normal, así como de cartílago osteoartrítico humano.

EJEMPLO 5: Análisis con transferencia Northern de la expresión de JAK3 en condrocitos articulares humanos

La cepa celular de condrocitos congelados HC30-0198 (condrocitos articulares humanos normales preparados tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1) se descongeló, se cultivó en monocapa (segundo pase) y se cultivó hasta 5 días después de la confluencia. Los cultivos del ensayo se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS),
40 seguida de la adición de cualquiera; 1) interleucina-1β recombinante humana (rhIL-1β) (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 2 ng/ml durante 24 horas en DMEM exento de suero que contenía 1% de solución antibiótica, o 2) DMEM exento de suero que contenía solo una solución antibiótica al 1% (testigo).

El ARN total del cultivo en monocapa se recogió después de 24 horas de cultivo utilizando el reactivo TRIzol (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se separaron 10 µg de ARN total de cada muestra anterior en un gel de formaldehído 2,2 M/agarosa al 1,2%, y se transfirieron a una membrana de soporte de nailon (Schleicher & Schuell, Keene, NH) mediante transferencia alcalina suave utilizando el sistema TURBOBLOTTER® (Schleicher & Schuell, Keene, NH) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN en la transferencia Northern se fijó a la membrana mediante el uso de un agente de reticulación por UV Stratalinker® 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

50 Un ADNc humano de 109 pares de bases para JAK3 se generó mediante RT-PCR (véase el Ejemplo 2 más arriba). El ADNc se marcó con [α-³²P] dCTP (New England Nuclear, Boston, MA) utilizando las perlas para marcar ADN de Ready-To-Go (-dCTP; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante, se purificó usando columnas CHROMA SPIN® +TE-30 (Clontech, Palo Alto, CA), y se utilizó como una sonda para un análisis de transferencia Northern.

55 La prehibridación y la hibridación de la transferencia Northern se realizaron a 42°C utilizando una dilución 1:1 de una solución 2X de prehibridación/hibridación (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) y formamida. Después de 15 horas de la hibridación utilizando la sonda de ADN de JAK3, la transferencia se lavó sucesivamente dos veces en 2X SSC/0,1%

de SDS (15 minutos/lavado a temperatura ambiente), y dos veces en 0,5X SSC/0,1% de SDS (30 minutos/lavado a 65°C). La transferencia se dejó secar al aire, y la señal radiactiva se visualizó utilizando un formador de imágenes con fósforo Fujifilm BAS-1500 (Fuji Medical Systems, USA, Stamford, CT).

5 La fosfoimagen de la transferencia Northern se proporciona como FIG. 4. Los resultados muestran que el ARNm de JAK3 se expresa en condrocitos articulares humanos adultos normales, cultivados, y que esa rhIL-1 β no aumenta ni disminuye el nivel de ARNm de JAK3 encontrado en condrocitos articulares humanos adultos normales no estimulados con rhIL-1 β . Además, la transferencia Northern revela que dos especies con el peso molecular de JAK3 son expresadas por condrocitos articulares humanos en cultivo monocapa: aproximadamente 4,2 kb y 2,2 kb de longitud. La forma predominante de ARNm de JAK3 expresado por condrocitos articulares humanos adultos normales cultivados es la forma de 2,2 kb. La forma más larga (4,2 kb) es compatible en tamaño con la encontrada en las células sanguíneas humanas normales de linaje linfocitario, y representa una pequeña fracción del ARNm total de JAK3 expresado en condrocitos.

Ejemplo 6: Inhibición de JAK3 con DBH

15 Para demostrar que DBH, un agente terapéutico eficaz para la enfermedad articular degenerativa tal como OA, actúa inhibiendo JAK3, se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con tirosina cinasa.

20 Placas de captura de fondo plano Nunc-Immuplate Maxisorp (Nunc Nalge International, Rochester, NY) se recubrieron con 80 μ l/pocillo de anticuerpo AcMo anti-fosfotirosina PY54 (Transduction Labs, Lexington, KY), diluido hasta 2 μ g/ml en tampón de recubrimiento (fosfato 10 mM, pH 7,2 + 0,02% de NaN₃), y se dejó adsorber durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron (todos los lavados son 4X con TBST: Tris/HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM + 0,05% de Tween-20), y se añadieron 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (TBST + 1% de BSA). Las placas se sellaron y se incubaron a 37°C durante 60 min o durante una noche a 4°C, y se lavaron de nuevo.

25 Las reacciones cinasas se realizaron en volúmenes de 50 μ l con sustrato peptídico biotinilado en una placa de fondo redondo (Coming, Coming, NY). Las mezclas de reacciones cinasas contenían; 20 μ l de péptido biotinilado GAS1 50 μ M (LCBiotina-EGPWLEEEEEAYGWDMDF-amida), ATP 0-1250 μ M en tampón cinasa, 10 μ l de MgCl₂ 50 mM en 2X tampón cinasa (imidazol/HCl 50 mM, DTT 2 mM, EDTA 0,2 mM, 0,030% de Brij-35, pH 6,8), 10 μ l de DBH 0-50 μ M en agua que contenía 0,2% de Pluronic-104 y 3% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), y 10 μ l de enzima JAK3 diluida en tampón cinasa. Una curva estándar de fosfopéptidos (0 - 10 nM) utilizando tampón cinasa como diluyente, también se sometió a ensayo.

30 Las reacciones cinasas se llevaron a cabo durante 30 min a 37°C, después se detuvieron mediante la adición de 15 μ l/pocillo de EDTA 0,125 M, pH 6,8. Partes alícuotas de 50 μ l/pocillo de soluciones detenidas se transfirieron a una placa de captura recubierta con anticuerpo, se sellaron y se incubaron a 37°C durante 60 min. La placa se lavó y se añadieron 80 μ l/pocillo de reactivo SA-HRP (Genzyme, Cambridge, MA) diluido 1/5 en tampón de dilución de Genzyme. La placa se selló y se incubó de nuevo a 37°C durante 60 min. La placa se lavó y se añadieron 100 μ l/pocillo de solución sustrato de tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), equilibrada previamente a temperatura ambiente, y se dejó reaccionar durante aproximadamente 5 min. La reacción se detuvo con 100 μ l/pocillo de solución de H₂SO₄ 1 N. Las muestras se leyeron a A_{450-A620}.

Los resultados del experimento (proporcionado como FIG. 6) revelan que DBH es un fuerte inhibidor de JAK3, con una constante de inhibición registrada (K_i) de 286 \pm 16 nM.

EJEMPLO 7: DBH (y sus variantes) inhibe específicamente JAK3

40 Para examinar adicionalmente las características de la inhibición con DBH (y sus variantes) frente a una variedad de componentes celulares, se realizó un ELISA poli (Glu, Tyr) 4:1. Himenialdisina (H), DBH (como extractos de esponjas marinas: véase Chipman y Faulkner, 1997), y tres formas de variantes de DBH sintética: la forma de base libre de DBH (DBH-2FB), una forma de sal de ácido trifluoroacético de DBH (DBH-2S), y una forma de sal de ácido metanosulfónico de DBH (DBHI) se solubilizaron en DMSO, y se sometieron a ensayo para estudiar la capacidad de inhibir; proteína tirosina cinasa ZAP-70 (polipéptido asociado a ζ de 70 kDa), BTK (tirosina cinasa de la agammaglobulinemia de Bruton), proteína tirosina cinasa JAK3 (Janus cinasa 3), LCK (proteína tirosina cinasa de linfocitos T linfocitos) e proteína tirosina cinasa de IGFR (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina).

50 Placas de microtitulación Maxisorb (Nalge Nunc International, Rochester, NY) se recubrieron con 1 mg/ml de poli(Glu, Tyr) 4:1 (Sigma, St. Louis, MO) solubilizado en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,02 % de azida de sodio. El día del ensayo, las placas de microtitulación se lavaron 4X con TBS-Tween (Tris 25 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween 20) utilizando un lavador de placas de Skatron (Skatron Instruments, Sterling, VA). Se añadieron 200 μ l de tampón de bloqueo estéril (3% de BSA en PBS, 0,02% de azida de sodio) a cada pocillo, y las placas de microtitulación se incubaron a 37°C durante 1 hora. El tampón de bloqueo se retiró, las placas se lavaron y se añadieron diversas concentraciones de inhibidor en un volumen de 20 μ l a los pocillos. A continuación, se añadieron 60 μ l de mezcla de sustrato apropiado. Las mezclas de sustrato se prepararon tal y como se describe en la Tabla 2:

Tabla 2: Solución de sustrato para ELISA poli (Glu, Try) 4:1.

	4X Tampón del ensayo*	ATP	MnCl ₂	MgCl ₂	H ₂ O
ZAP-70	2 ml	1 ml 500 µM	1 ml 100 mM	--	2 ml
BTK	2 ml	1 ml 500 µM	1 ml 100 mM	1 ml 10 mM	1 ml
JAK3	2 ml	1 ml 500 µM	--	1 ml 100 mM	2 ml
LCK	2 ml	1 ml 500 µM	1 ml 100 mM	1 ml 100 mM	1 ml
IGFR	2 ml	1 ml 500 µM	1 ml 100 mM	1 ml 50 mM	1 ml

* (4X Tampón de ensayo es imidazol 100 mM pH 6,8, EDTA 0,4 mM, DTT 4 mM, 0,06% de Brij-35)

Después de la adición de la mezcla de sustrato, se añadieron 20 µl de la proteína tirosina cinasa de la prueba (en tampón de ensayo 1X). Las reacciones de cinasa se incubaron 30 min a 37°C, seguido de lavados en el lavador de placas de Skatron. Se añadieron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PT-66 biotinilado (Sigma, St. Louis, MO) (diluido 1:4000 en BSA al 0,5%, TBS filtrada de forma estéril) a cada pocillo, y se incubaron durante otros 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de conjugado de estreptavidina-HRP (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) diluidos 1:32.000 en 0,5% de BSA-TBS filtrada de forma estéril, a cada pocillo, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de solución sustrato de tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 100 µl de reactivo de detención (ácido fosfórico 1 M). Las muestras se leyeron a continuación a 450 nm en un lector de placas.

Cuatro lotes de H de extracto marino (denominados 979-1, 979-4, 979-5, 979-6) y dos lotes de DBH de extracto marino (denominados 5025-11 y 5025-12) mostraron baja inhibición específica micromolar de JAK3, con valores ce-50 (concentración eficaz para un 50% de inhibición) que iban desde 2,6 µM - 10,7 µM (lotes 979) y 23,4 µM-34,4 µM (lotes 5025) (FIG. 7). La inhibición de ZAP-70, LCK, BTK e IGFR era débil, con valores ce-50 que iban desde cientos de valores micromolares, a ninguna inhibición (datos no mostrados).

Las tres formas de DBH sintética sometidas a ensayo también mostraron inhibición de JAK3, con valores ce-50 que iban de 11,60 µM - 53,99 µM (FIG. 8A). DBH-2FB mostró la mayor inhibición de JAK3 en comparación con las dos formas de sal de DBH (es decir, 11,60 µM). También se muestra que DBH-2FB es un inhibidor selectivo de JAK3, con valores de ce-50 para ZAP-70, LCK, BTK e IGFR que van desde 1,971 µM hasta ninguna inhibición (FIG. 8B).

Estos resultados muestran que DBH y sus diversos derivados son inhibidores específicos de JAK3.

EJEMPLO 8: Regulación a la baja de ARNm asociados con OA mediante DBH (y sus variantes)

Para examinar los efectos aguas abajo de la inhibición de JAK3 mediante DBH, se realizaron ensayos de transferencia Northern para detectar cambios en los niveles de ARNm en estado estacionario de diversas moléculas asociado con la OA.

La cepa celular de condrocitos articulares humanos congelados HC30-0198 (descrita en el Ejemplo 1) se descongeló y se cultivó en monocapa en matraces de cultivo de tejidos T150 (Corning Costar, Cambridge, MA), como se ha descrito anteriormente hasta 1-5 días después de confluencia. Los cultivos del ensayo se enjuagaron en PBS, y se preincubaron durante 2 horas con 10 ml de DMEM exento de suero que contenía DBH 5 µM (sintética), en su forma de base libre o en forma de sal de ácido trifluoroacético. A continuación, se añadieron 10 ml adicionales de DMEM exento de suero que contenía DBH 5 µM, 4 ng/ml de interleucina-1β recombinante humana (rhIL-1β; concentración final de 2 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN), y solución antibiótica al 2% (concentración final de 1%), durante 24 horas.

Dos cultivos testigos se ejecutaron en paralelo: uno sin DBH (rhIL-1β sola) y otro sin DBH o rhIL-1β.

El ARN total del cultivo en monocapa se recogió utilizando reactivo TRIzol (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se separaron 10 µg de ARN total de cada muestra de ensayo anterior, en un gel de formaldehído 2,2 M/agarosa al 1,2%, y se transfirieron a una membrana de soporte de nailon (Schleicher & Schuell, Keene, NH) mediante transferencia alcalina suave utilizando el sistema TURBOBLOTTER® (Schleicher & Schuell, Keene, NH) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN total se fijó a la membrana utilizando un agente de reticulación Stratilinker® 1800 UV (Stratagene, La Jolla, CA).

Las sondas de ADN humano para estromelisin-1 (MMP-3), colagenasa 1 (MMP-1), ciclooxigenasa II (COX-2), NF-κB (p65), factor de necrosis tumoral α (TNF-α) e interleucina-6 (IL-6) se marcaron con [α-³²P] dCTP (New England

Nuclear, Boston, MA) utilizando las perlas de marcación de ADN Ready-To-Go (-dCTP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Las sondas radiactivas fueron separados del [α - 32 P] dCTP no incorporado, empleando columnas CHROMA SPIN[®] +TE-30 (Clontech, Palo Alto, CA), y las sondas purificadas se utilizaron para experimentos de hibridación de transferencia Northern.

5 La prehibridación y la hibridación de las transferencias Northern con las sondas radioactivas se realizaron usando una solución de hibridación ExpressHyb[®] (Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. La transferencia se lavó sucesivamente dos veces en 2X SSC/0,05% de SDS (15 minutos/lavado a temperatura ambiente), y dos veces en 0,1 X SSC/0,1% de SDS (30 minutos/lavado a 65°C). La transferencia se dejó secar al aire, y la señal radiactiva se visualizó y se cuantificó usando un formador de imágenes de Fujifilm, BAS-1500 (Fuji, Stamford, CT).

10 La normalización de la carga de ARN se realizó mediante tinción con bromuro de etidio de la transferencia Northern. Se añadieron 5 μ l de 10 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO) a 50 ml de 1X solución MOPS (tampón MESA : Sigma, St. Louis, MO), y se tiñeron durante 7 min a temperatura ambiente. La transferencia se lavó durante 30 min (3 veces) con 1X tampón MOPS. El patrón de la tinción con bromuro de etidio se visualizó en una caja oscura inteligente de Fujifilm LAS-1000 (Fuji Medical Systems, USA, Stamford, CT).

15 Los resultados de los experimentos de transferencia Northern (mostrados en las FIGs. 9A y 9B) muestran que 5 μ M del inhibidor de JAK3, DBH, eran capaces de inhibir en diferentes medidas la regulación positiva inducida por IL-1 β de ARNm conocidos, o que se creía que estaban asociados con la patología de (osteo)artritis: estromelisin (MMP-3), colagenasa 1 (MMP-1), ciclooxigenasa II (COX-2), NF κ B (p65), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina-6.

Es interesante la observación inesperada de que la forma de base libre de DBH inhibe los ARNm inducidos por rhIL-1 β en mayor grado que la forma de sal de ácido trifluoroacético de DBH en algunos ARNm (FIG. 9A). Esta observación es compatible con los datos obtenidos en los ensayos con tirosina cinasa del Ejemplo 7.

Ejemplo 9: Inhibición con DBH de la actividad de agreganasa inducida por IL-1 α en condrocitos bovinos

25 Para demostrar los efectos celulares de DBH como un inhibidor específico de JAK3, la inhibición de DBH y sus variantes se midió mediante la liberación de proteoglicano marcado con 35 S inducido con IL-1 α en condrocitos bovinos (Está bien establecido que la liberación de proteoglicanos inducida con IL-1 α en condrocitos bovinos primarios cultivados y explantes de cartílago, es debida a la escisión de agregcano a través de la enzima conocida como agregcanasa).

30 Los condrocitos articulares bovinos primarios fueron aislados a partir de cartílago articular diseccionado de articulaciones de ternero machacadas utilizando un tratamiento con 1 mg/ml de hialuronidasa durante treinta minutos (37°C) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), seguido de un tratamiento con 2 mg/ml de colagenasa P durante treinta minutos (37°C) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y 2,5 mg/ml de tripsina (GIBCOBRL, MD). Las soluciones enzimáticas se prepararon en medio esencial modificado de Dulbecco/medio de Ham F-12 (DMEM/F12) 1:1 exento de suero, y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 μ m de Millex[®]-GV (Millipore S.A., Molsheim, Francia). Una tercera digestión durante la noche (0,5 mg/ml de colagenasa P a 37°C) se realizó en un matraz de agitación Bellco.

35 Los condrocitos bovinos fueron recuperados mediante la adición de un volumen igual de DMEM/F12 complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) para neutralizar las enzimas, se filtraron a través de un colador de células de 70 μ m de nylon de Falcon[®] (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min a temperatura ambiente.

40 Los condrocitos se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos de Costar[®] (Coming, Coming, NY) a 8×10^4 células/pocillo empleando 0,5 ml de DMEM/F12 1:1, 10% de FBS, 1% de solución de antibiótico (penicilina, estreptomycin, fungizona) (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), y se incubaron a 37°C, 8% de CO₂. Las células se cultivaron durante 28 días con realimentación cada tercer día con DMEM/F12 más 10% de FBS, 1% de solución de antibiótico.

45 La marcación metabólica de los proteoglicanos se realizó el día 22 con 10 μ Ci de 35 Sulfato (Amersham, Arlington Heights, IL) en DMEM/F12 exento de suero, 1% de solución de antibiótico, durante 48 horas. El 35 Sulfato libre se eliminó día 24, los condrocitos se lavaron con PBS y se volvieron a alimentar con DMEM/F12 más 10% de suero, 1% de solución de antibiótico. Los condrocitos se cultivaron durante dos días adicionales, se volvieron a alimentar el día 26 con DMEM/F12 más 10% de suero, 1% de solución de antibiótico y se lavaron el día 27 con PBS.

Después del lavado con PBS, los condrocitos fueron tratados con 0,5 ml de DMEM/F12 exento de suero, 1% de solución de antibiótico que contenía ya sea; 1) no más suplementos, o 2) DBH 5 μ M (ya sea DBH1, DBH-2S o DBH-FB). Después de 2 horas, se añadió rhIL-1 α a los cultivos (excepto para el testigo no rhIL-1 α), hasta tener una concentración final de 1 ng/ml.

55 En el día 28, se retiraron 0,5 ml del medio y se colocaron en un minivial de centelleo. Se añadieron 4 ml de fluido de centelleo y la radiactividad en el medio se cuantificó por recuento del centelleo. La capa de células se lavó en PBS y

se recogió con 0,5 ml de 1X tripsina-EDTA, y se cuantificó por recuento del centelleo como anteriormente. Todas las muestras se cultivaron por triplicado.

Los datos se determinaron y se expresaron del modo siguiente:

- 5 1. Fracción_c de ruido de fondo = fracción de la radiactividad total (medio + capa celular) que representa la cantidad de radioactividad no inducida por IL-1 liberada en el medio.
- $$= \frac{\text{CPMs totales en el medio del "testigo sin IL-1}\alpha, \text{ ni DBH "}}{\text{CPMs totales en el medio del testigo sin IL-1}\alpha, \text{ ni DBH " + CPMs totales en la capa celular del "testigo sin IL-1}\alpha, \text{ ni DBH"}}$$
2. % de liberación de proteoglicano marcado con ³⁵S en medio mediante IL-1α
- 10 a) Ruido de fondo = Cuentas en el medio de la muestra del ensayo debidas a la liberación no inducida por IL-1
- $$= \text{Fracción}_c \text{ de ruido de fondo [CPM total en el medio de la muestra del ensayo + CPM total en la capa de células de la muestra del ensayo]}$$
- b) CPMs liberadas por IL-1α = CPM total en el medio - Ruido de fondo
- 15 c) % de liberación mediante IL-1α = [CPM liberadas mediante IL-1α / (CPM liberadas mediante IL-1α + CPM totales en la capa de células)] 100 %
3. % de liberación mediante IL-1α en presencia de DBH =
- $$\frac{\{(\text{CPM total en la muestra con medio de DBH} - \text{Ruido de fondo}) / [(\text{CPM total en la muestra de medio con DBH} - \text{Ruido de fondo}) + \text{CPM total in la muestra de la capa celular con DBH}]\}}{100\%}$$
- 20 4. % de inhibición mediante DBH = [1 - (% de liberación mediante IL-1α en presencia de DBH / % de liberación mediante IL-1α)] 100%

Las tres formas de DBH sintética (es decir, DBH1, DBH-2S o DBH-FB) mostraron diversos grados de inhibición de la liberación de proteoglicanos marcados con ³⁵S inducida mediante IL-1α: □ 50%, □ 40% y 100%, respectivamente (FIG. 10). Una vez más la forma de base libre de DBH como inhibidor produjo resultados muy superiores a los de las otras dos formas de DBH.

Ejemplo 10: Regulación a la baja de los ARNm asociados con OA mediante el Compuesto WHI-P131

Para demostrar que DBH y sus compuestos relacionados actúan como un agente terapéutico eficaz para OA al funcionar como un inhibidor específico de JAK3, y para confirmar la eficacia de los inhibidores de JAK3 en general como inhibidores de compuestos asociados con OA y, por lo tanto, como una nueva clase de agentes terapéuticos para OA, se evaluó la inhibición de diversos ARNm asociados con OA a través del inhibidor bien conocido específico de JAK3, 4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina (también denominado en la técnica WHI-P131).

Se aislaron condrocitos articulares humanos normales a partir de cortes de cartilago y se cultivaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. Experimentos de inhibición del ARNm se realizaron de forma idéntica a los protocolos descritos en el Ejemplo 8, con la excepción de que se usó el inhibidor específico de JAK3, WHI-P131 (4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina, comprada en A.G. Scientific, San Diego, CA), en lugar de DBH. Se sometieron a ensayo dos concentraciones de WHI-P131, solubilizado en DMSO: 33,6 μM y 168 μM.

Los resultados del experimento de transferencia Northern (que se muestra en la FIG. 11) muestran que tanto el tratamiento con 33,6 μM como con 168 μM del inhibidor específico de JAK3, WHI-P131, inhibe la regulación positiva inducida por IL-1β de los ARNm conocidos, o que se cree, que están asociados con la patología de (osteo)artritis: es decir, estromelisina-1 (MMP-3), colagenasa 1 (MMP-1), ciclooxigenasa II (COX-2) y NF-kB (p65).

La presente invención incorpora como referencia en su totalidad las técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a las técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3ª ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 págs. (ISBN 0-632-01318-4).

45 Sambrook, J. et al. compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgauffs). 634 págs. (ISBN 0-89573-614-4).

Referencias

- Abbaszade et al., 1999. *J Biol. Chem.* 274(33):23443-23450.
- Alaaeddine et al., 1997. *Arthritis Rheum.* 40:839.
- Aman y Leonard, 1997. *Current Biology* 7:R784-788.
- 5 Argetsinger et al., 1993. *Cell* 74:237.
- Aringer et al., 1999. *Life Sci.* 64(24):2173-2186.
- Amer et al., 1997. *J. Biol. Chem.* 272(14):9294-9299.
- Asahara et al., 1997. *Arthritis Rheum.* 40: 912-918.
- Attur et al. 1998. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110(1):65-72.
- 10 Blank et al., 1989. *Nature* 337: 187-189.
- Buckley et al., 1997. *J. Pediatr.* 130:378-387.
- Buttle et al., 1993. *Arth. Rheum.* 12:1709.
- Caron et al., 1996. *Arthritis Rheum.* 39:1535-1544.
- Chen et al., 1997. *PNAS USA* 94:6910-6915.
- 15 Chen et al., 1999. *Pharm. Res.* 16(1):117-122.
- Chipman y Faulkner, documento de PAT de EE.UU. nº 5.591.740 (7 de enero 1997).
- Chung et al., 1997. *Science* 278:1803-1805.
- Civin et al. documento de PAT de EE.UU. nº 5.705.625 (6 de enero 1998).
- Civin et al. documento de PAT de EE.UU. nº 5.916.792 (29 de junio 1999).
- 20 Costello et al. 1996. *Oncogene* 13: 2595-2605.
- Danial et al., 1995. *Science* 269:1875-1877.
- Darnell et al., 1994. *Science* 264:1415-1421.
- Darnell, 1997. *Science* 277:1630-1635.
- Dean et al., 1989 *J. Clin. Invest.* 84:678-685.
- 25 De-Fraja et al., 1998. *J. Neurosci. Res.* 54(3):320-330.
- Disanto et al., 1995. *PNAS USA* 92:377-381.
- Endo et al., 1997. *Nature* 387: 921-924.
- Farrell et al. 1992. *Ann. Rheum. Dis.* 51:1219-1222.
- Fernandes et al., 1997. *Arthritis Rheum.* 40:284-294.
- 30 Firestein et al., 1991. *Arthritis Rheum.* 34: 1094-1105.
- Firestein, 1996. En: *Textbook of Rheumatology*. Kelly et al. (compiladores) 5ª edición págs. 851-897.
- Firestein y Manning, 1999. *Arthritis Rheum.* 4: 609-621.
- Firmbach-Kraft et al., 1990. *Oncogene* 5:1329.
- Galli, 1993. *N. Engl. J. Med.* 328, 257-265.
- 35 Gauzzi et al., 1996. *J Biol. Chem.* 271, 20494-20500.
- Gazit et al., 1989. *J. Med. Chem.* 32:2344-2352.
- Goldring, 1999. *Connective Tissue Res.* 40(1):1-11.

- Goodman et al., 1998. *J Biol. Chem.* 273, 17742-17748.
- Gordon y Galli, 1990. *Nature* 346: 274-276.
- Gurniak y Berg, 1996. *Blood* 87(8):3151-3160.
- Hamaway et al., 1995. *Cell. Signalling* 7:535-544.
- 5 Han et al., 1998. *Autoimmunity* 28:197-208.
- Hanks et al., 1991. *Meth. Enzymol.* 200:38.
- Harpur et al., 1992. *Oncogene* 7:1347.
- Helden y Purton (compiladores) 1996. En: *Signal Transduction* págs. 19-31.
- Henderson y Pettipher, 1989. *Clin. Exp. Immunol.* 75:306-310.
- 10 Hilton et al., 1998. *PNAS USA* 95:114-119.
- Home, 1997. *J. Org. Chem.* 62: 456.
- Hou et al., 1996. *Cell* 84:411-419.
- Huang et al., 1999. *Biochem J.* 342(pt1):231-238.
- Hunter, 1991. *Meth. Enzymol.* 200:3.
- 15 Ihle et al., 1994. *TIBS* 19:222-227.
- Ihle y Kerr, 1995. *Trends Genet.* 11: 69-74.
- Ihle, 1995. *Nature* 377: 591-594.
- Ihle, 1996. *Philos. Trans. R. Soc. Lond-Biol. Sci.* 351:159-166.
- Ihle, 1996. *Cell*, 84331 -334(3).
- 20 Izuhara et al., 1996. *J Biol. Chem.* 271, 619-622.
- Johnston et al., 1995. *J Biol. Chem.* 270, 28527-28530.
- Joosten et al., 1997. *Arthritis Rheum.* 40:249-260.
- Karin et al. 1997. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.
- Kawamura et al., 1994. *PNAS USA* 91:6374-6378.
- 25 Keegan et al., 1995. *PNAS USA* 92:7681-7685.
- Kirken et al., 1999. *J. Leukoc. Biol.* 65:891-899.
- Kolenko et al., 1999. *Blood* 93(7):2308-2318.
- Kumar et al., 1996. *Oncogene* 13: 2009-2014.
- Lai et al., 1995. *J Biol. Chem.* 270, 25028-25036.
- 30 Lee et al., 1994. *Nature* 372: 739-746.
- Lefebvre, et al., 1990. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152:366.
- Levitzki y Gazit. 1995. *Science* 267:1782-1788.
- Levy, 1997 *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:81-90.
- Liu et al., 1997. *Curr. Biol.* 7(11):817-826.
- 35 Lohmander et al., 1993. *Arthritis Rheum.* 36:181-189.
- Luttichen et al., 1994. *Science* 263:89.
- Luo et al., 1995. *EMBO J.* 14:1412-1420.

- McCachren et al., 1990. *J. Clin. Immuno.* 10:19-27.
- McCartney-Francis et al. 1993. *J.Exp. Med.* 178:749-754.
- Macchi et al., 1995. *Nature* 377: 65-68.
- McDonnell, et al., 1992. *Arth. Rheum.* 35:799.
- 5 Magrassi et al., 1999. *J. Neurosurg.* 91(3):440-446.
- Malaviya et al., 1993. *J Biol. Chem.* 268, 4939-4944.
- Malaviya et al., 1999. *J. Biol. Chem.* 274(38):27028-27038.
- Malaviya y Uckun, 1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:807-813.
- Mankin, 1971. *Orthopedic Clinics of North America* 2: 19-30.
- 10 Mankin y Brandt, 1991. En: *Textbook of Rheumatology*, Kelly, et al., (compiladores) 3ª edición, págs.14699-111471.
- Matrisian, 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 732:42-50.
- Matsumoto et al., 1997. *Blood* 89:3148-3154.
- Meydan et al., 1996. *Nature* 379: 645-648.
- Migon et al., 1995. *Science* 269:79-81.
- 15 Minden y Karin, 1997. *Biochim Biophys Acta* 1333:F85-F104.
- Miyazaki y Taniguchi, 1996. *Cancer Surveys* 27:25-39.
- Mort, et al., 1993; *Matrix*, 13:95.
- Mow et al., 1992. *Biomaterials* 13:67-97.
- Muller et al., 1993. *Nature* 366:129.
- 20 Murphy et al., 1987. *Biochem J.* 248:265 -268.
- Musso et al., 1995. *J.Exp. Med.* 181:1425-1431.
- Nambi y Pantil. documento WO 93/16703 (2 de septiembre 1993).
- Nambi y Pantil. documento de PAT de EE.UU. nº 5.616.577 (1 de abril 1997).
- Nelson et al., 1996. *Mol. Cell. Biol.* 16:369-375.
- 25 Nicholson y Hilton, 1998. *J. Leukocyte Biol.* 63:665-668.
- Naka et al., 1997. *Nature* 387: 924-929.
- Nosaka et al., 1995. *Science* 270:800-802.
- Ohya et al., 1997. *J Biol. Chem.* 272, 27178-27182.
- Oliver et al., 1994. *J Biol. Chem.* 269, 29697-29703.
- 30 Page-Thomas, 1991. *Ann. Rheum. Dis.* 50:75-80.
- Pelletier et al., 1991. *Sem. Arth. Rheum.* 20:12.
- Pelletier et al., 1993. *Am. J. Pathol.* 142(1):95-105.
- Pelletier et al., 1997. En: *Arthritis an Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology Vol 2.* Koopman (compilador) 13ª edición, págs. 1969-1984.
- 35 Pelletier et al., 1992. En: *Cartilage degradation: Basic and Clinical Aspects.* Howell y Woessner (compiladores) págs.503-528.
- Pelletier et al., 1993. En: *Osteoarthritis, Edition of Rheumatic Disease Clinic of North America.* Moskowitz (compilador) págs. 545-568.

- Pendas et al. 1997; Genomics 40:222-233.
- Reboul et al., 1996. 97(9) J. Clin. Invest., 2011-2019
- Reno et al. 1997. BioTechniques 22:1082 -1086(6).
- Rogachefsky et al., 1993. Osteoarthritis & Cartilage 1:105-114.
- 5 Rolling et al., 1996. FEBS lett. 393:53-56.
- Rui et al., 1994. J. Biol. Chem. 269:5364:
- Rutter et al. 1997. J. Cell. Biochem. 66:322-336.
- Saijo et al., 1997. J.Exp. Med. 185:351-356.
- Scharenberg et al., 1995. EMBO J. 14:3385-3395.
- 10 Schindler y Darnell Jr., 1995. Ann. Rev. Biochem. 64:621-651.
- Schumacher et al., 1999. Prenat. Diagn. 19(7):653-656.
- Seger y Krebs 1995. FASEB J 9:726-735.
- Sharpe et al. documento WO 97/11692 (3 de abril 1997).
- Silvennoinen et al., 1997. APMIS 105:497-509.
- 15 Stahl et al., 1994. Science 263:92.
- Starr et al., 1997. Nature 387: 917-921.
- Stephenson, et al., 1987. Biochem. Biophys. Res. Comm. 144:583.
- Stockwell, 1991. Clin. Anat. 4:161-191.
- Subramaniam et al., 1999. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262:14-19.
- 20 Sudbeck et al., 1999. Clin. Cancer Res. 5, 1569-1582.
- Taniguchi, 1995. Science 268:251-255.
- Thomis y Berg, 1997. J. Exp. Med. 185:197-206.
- Thomis et al., 1995. Science 270:794-797.
- Tortolani et al., 1995. J Immunol 155: 5220-5226.
- 25 Tortorella et al., 1999. *Science*. 284: 1664-1666.
- Uckun et al., 1999. Clin. Cancer Res. 5(10):2954-2962.
- Urban, 1994. Br. J. Rheumatol 33: 901-908.
- Van Beuningen et al., 1994. Lab. Invest. 71:279-290.
- Velazquez et al., 1992. Cell 70:313.
- 30 Veldhuijzen et al., 1979. J. Cell. Physiol. 98: 299-306.
- Venn et al., 1993. Arthritis Rheum. 36:819-826.
- Villa et al., 1996. Blood 88:817-823.
- Wang et al., 1999; J. Immunol. 162(7) :3897-3904;
- Watling et al., 1993. Nature 366:166.
- 35 Wilks, 1989. PNAS USA 86:1603.
- Wilks et al., 1991. Mol. and Cell. Biol. 11:2057.
- Wilson, 1988. En: Medicine For the Practicing Physician. Hurst et al. (compiladores) 2ª edición, págs. 202-204.

Witthuhn et al., 1993. Cell 74:227.

Witthuhn et al., 1994. Nature 370: 153-157.

Witthuhn et al., 1999. Lymphoma Leukemia 32:289-297.

Yoshimura et al., 1995. EMBO J. 14:2816-2826.

5 Yu et al., 1998. J Immunol 161: 218-227.

Zhang, et al. 1996, PNAS USA 93:9148-9153.

Zuoning et al. 1999. Pharmacol. Exp. Therap. 291(1):124-130.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar compuestos que inhiben JAK3 útiles para tratar la osteoartritis, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto JAK3 con un compuesto candidato, y
- 5 (b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.
2. Un método celular o tisular *in vivo* para detectar compuestos que inhiben JAK3 en animales no humanos útil para tratar la osteoartritis, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto JAK3 con un compuesto candidato, y
- (b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en donde dicho método comprende poner en contacto el compuesto candidato con una célula o tejido.
4. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho método comprende poner en contacto el compuesto candidato con condrocitos.
- 15 5. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho método comprende poner en contacto JAK3 con una genoteca de compuestos candidatos.
6. Un método *in vitro* para detectar compuestos que inhiben JAK3 útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que implica una degradación del cartílago, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto los condrocitos con un compuesto candidato, y
- (b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.
- 20 7. Un método celular o tisular *in vivo* para detectar compuestos que inhiben JAK3 en animales no humanos útil para tratar una enfermedad o trastorno que implica una degradación del cartílago, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto condrocitos con un compuesto candidato, y
- (b) detectar una disminución de la actividad de JAK3.
- 25 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 6 o 7, en donde dicho método comprende poner en contacto dichos condrocitos con una genoteca de compuestos candidatos.

RT-PCR de JAK3 : Cartilago Osteoartrítico Humano

Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	----- AGGGGAGAT TCAGATCCTC AAAGCACTGC ACAGTGATTT CATTGTCAAG -----	2750
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	----- TATCGTGGTG TCAGCTATGG CCGGGGCCGG CCAGAGCTGC GGCTGGTGTAT -----	2 2800
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	GGAGTACTTG CCCAGGGGT GCTTGGCGGA ACTTCTTGG AGGGCACCG CGAGTACTTG CCCAGGGGT GCTTGGCGGA CTTCCTGC AGCGGCACCG -----	52 2848
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	CGGGCGGTTN GATGCCAGCC GCTTCTTNT NTATTCTTTC GCAGATCTGC CGGGCGGTTT GATGCCAGCC GCTTCTTNT NTATTCTTTC GCAGATCTGC -----	102 2897
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	AAGGCATGG AGTACNTGGG CTTCCGCCGG CTGCGTGCAC CGCGACCTGG AAGGCATGG AGTACNTGGG CTTCCGCCGG CTGCGTGCAC CGCGACCTGG -----	152 2946
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	CGCCCCGAAA CAGCNCNCGT GGAGAGCGAG GCACACGCCA AGCCGCTGA CGCCCCGAAA CAGCNCNCGT GGAGAGCGAG GCACACGCCA AGATCGCTGA -----	201 2995
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	CTTCGGCCCTA GCA----- CTTCGGCCCTA GCTTAAGCTGC TGCCCGTTGA CAAGAGACTAC TACGTGGTCC -----	214 3045
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	----- GGGAGCCAGG CCAGAGCCCC ATTTTCTGGT ATGCCCCCGA ATCCCTCTCG -----	214 3095
Copia de Comp del histograma 19.1 hJAK-3 U09607 ACC	----- GACAACATCT TCTCTCGCCA GTCAGAGCTC TGGAGCTTCC GGGTGGTCTCT -----	214 3145

FIGURA 2

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocito humano

ADNc de JAK3 hum; U09607	CAGGACTCC CACCATTCT TCTGCAAGGA GGTGGCACCG CCGAGGCTGC	1200
Complemento del clon 3 -2 KS	-----	
Clon 3 -2 SK	CACGGACTCC CAGCACTTCT TCTGCAAGGA GGTGGCACCG CCGAGGCTGC	84
Complemento del cebador del clon 3 -2	-----	
cebador 1 del clon 3 -2	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGGAGGAAGT GGCCGAGCAG TGCCACGGCC CCATCACTCT GGACTTTGCC	1250
Complemento del clon 3 -2 KS	-----	
Clon 3 -2 SK	TGGAGGAAGT GGCCGAGCAG TGCCACGGCC CCATCACTCT GGACTTTGCC	134
Complemento del cebador del clon 3 -2	-----	
cebador 1 del clon 3 -2	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	ATCAACAAGC TCAAGACTGG GGGCTCACGT CCTGGCTCCT ATGTTCTCCG	1300
Complemento del clon 3 -2 KS	-----	
Clon 3 -2 SK	ATCAACAAGC TCANGACTGG GGGCTCACGT CCTGGCTCCT ATGTTCTCCG	184
Complemento del cebador del clon 3 -2	-----	
cebador 1 del clon 3 -2	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	CCGCAGCCCC CAGGACTTTG ACAGETTCCT CCTCACTGTC TGTGTCACAGA	1350
Complemento del clon 3 -2 KS	-----	
Clon 3 -2 SK	CCGCAGCCCC CAGGACTTTG ACAGETTCCT CCTCACTGTC TGTGTCACAGA	234
Complemento del cebador del clon 3 -2	-----	
cebador 1 del clon 3 -2	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	ACCCCTTGG TCCTGATTAT AAGGCTGCC TCATCCGGCG CAGCCCCACA	1400
Complemento del clon 3 -2 KS	-----	
Clon 3 -2 SK	ACCCCTTGG TCCTGATTAT AAGGCTGCC TCATCCGGCG CAGCCCCACA	284

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADnc de condrocitos humanos

Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ADnc de JAK3 hum; U09607						
Complemento del clon 3 - 2 KS	GGAACCTTCC	TTCTGGTTGG	CCTCAGCCGA	CCCCACAGCA	GTCTTCGAGA	1450
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	GGAACCTTCC	TTCTGGTTGG	CCTCAGCCGA	CCCCACAGCA	GTCTTCGAGA	334
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADnc de JAK3 hum; U09607						
Complemento del clon 3 - 2 KS	GCTCCTGCCA	ACCTGCTGGG	ATGGGGGGCT	GCACGTAGAT	GGGTGGCAG	1500
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	GCTCCTGCCA	ACCTGCTGGG	ATGGGGGGCT	GCACGTAGAT	GGGTGGCAG	384
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADnc de JAK3 hum; U09607						
Complemento del clon 3 - 2 KS	TGACCCCTCAC	TTCTGTCTGT	ATCCCCAGAC	CCAAAGAAAA	GTCCAACCTG	1550
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TGACCCCTCAC	TTCTGTCTGT	ATCCCCAGAC	CCAAAGAAAA	GTCCAACCTG	434
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADnc de JAK3 hum; U09607						
Complemento del clon 3 - 2 KS	ATCGTGGTCC	AGAGAGGTCA	CAGCCCACCC	ACATCATCCT	TGGTTCAGCC	1600
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	ATCGTGGTCC	AGAGAGGTCA	CAGCCCACCC	ACATCATCCT	TGGTTCAGCC	484
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

ADNc de JAK3 hum; U09607	CCAATCCCAA	TACCAGCTGA	GTCAGATGAC	ATTTACAAG	ATCCCTGCTG	1650
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	CCAATCCCAA	TACCAGCTGA	GTCAGATGAC	ATTTACAAG	ATCCCTGCTG	534
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	ACAGCCTGGA	GTGSCATGAG	AACCTGGGCC	ATGGGTCTT	CACCAAGATT	1700
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	ACAGCCTGGA	GTGSCATGAG	AACCTGGGCC	ATGGGTCTT	CACCAAGATT	584
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	TACCGGGCT	GTGCCATGA	GGTGGTGGAT	GGGAGGCC	GAAAGACAGA	1750
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	TACCGGGCT	GTGCCATGA	GGTGGTGGAT	GGGAGGCC	GAAAGACAGA	634
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	GGTGCTGCTG	AAGGTCATGG	ATGCCAAGCA	CAAGAACTGC	ATGGAGTCAT	1800
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	GGTGCTGCTG	AAGGTCATGG	ATGCCAAGCA	CAAGAACTGC	ATGGAGTCAT	684
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	TCCTGGAACC	AGCGACTTG	ATGAGCCAAG	TGTCGTACCG	GCATCTCGTG	1850
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	TCCTGGAACC	AGCGACTTG	ATGAGCCAAG	TGTCGTACCG	GCATCTCGTG	734
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
ADNc de JAK3 hum; U09607	CTGCTCCACG	GCGTGTGCAT	GGCTGGAGAC	AGCACCATGG	TGCAGGAATT
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----
Clon 3 - 2	CTG-TTCACG	GCGTGTGCAT	GGCTGGA	-----	-----
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGTACACCTG	GGGGCCATAG	ACATGTATCT	GCGAAAACGT	GGCCACCCTGG
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGCCAGCCAG	CTGGAAGCTG	CAGGTGGTCA	AACAGCTGGC	CTACGCCCTC
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
ADNc de JAK3 hum; U09607	AACTATCTGG	AGGACAAAGG	CCTGCCCCCAT	GCAATGTCT	CTGCCCGGAA
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
ADNc de JAK3 hum; U09607	GGTGTCTCTG	GCTCGGAGG	GGCTGATGG	GAGCCCCCCC	TTCATCAAGC
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

ADNc de JAK3 hum; U09607	CAATTTTATG AGGACCGGCA GCAGCTGCCG GCCCCCAAGT GGACA-GAGC	2349
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	
Clon 3 - 2	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	CAATTTTATG AGGACCGGCA GCAGCTGCCG GCCCCCAAGT GGACAAGC	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	125
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGGCCCTGCT GATTCAACAG TGCATGGCCT ATGAGCCGGT CCAGAGGCC	2399
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	
Clon 3 - 2	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TGGCCCTGCT GATTCAACAG TGCATGGCCT ATGAGCCGGT CCAGAGGCC	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	175
ADNc de JAK3 hum; U09607	TCCTTCCGAG CCGTCATTCC TGACCTCAAT AGCCTCATCT CTTCAGACTA	2449
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	
Clon 3 - 2	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TCCTTCCGAG CCGTCATTCC TGACCTCAAT AGCCTCATCT CTTCAGACTA	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	225
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGAGTCCCTC TCAGACCCCA CACCTGGTGC CCTGGCACCT CGTGATGGGC	2499
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	
Clon 3 - 2	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TGAGTCCCTC TCAGACCCCA CACCTGGTGC CCTGGCACCT CGTGATGGGC	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	275
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGTGGAATGG TCCCCAGCTC TATGCCTGCC AAGACCCAC GATCTTCGAG	2549
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TGTGGATGG	TGCCCAGCTC	TATGCTGCC	AAGACCCAC	GATCTTCGAG	325
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	GAGAGACACC	TCAAGTACAT	CTCACACTG	GGCAAGGCA	ACTTTGGCAG	2599
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	GAGAGACACC	TCAAGTACAT	CTCACACTG	GGCAAGGCA	ACTTTGGCAG	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	375
ADNc de JAK3 hum; U09607	CGTGGAGCTG	TGCCGCTATG	ACCCGCTAGC	CCACAATACA	GTTGCCCTGG	2649
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	CGTGGAGCTG	TGCCGCTATG	ACCCGCTAGG	CGACAATACA	GTTGCCCTGG	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	425
ADNc de JAK3 hum; U09607	TGGCCGTGAA	ACAGCTGCAG	CACAGCGGC	CAGACCAGCA	GAGGGACTTT	2699
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	TGGCCGTGAA	ACAGCTGCAG	CACAGCGGC	CAGACCAGCA	GAGGGACTTT	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	475
ADNc de JAK3 hum; U09607	CAGCCGGAGA	TTCAGATCCT	CAAAGCACTG	CACACTGATT	TCATTGTCAA	2749
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
Complemento del cebador del clon 3 - 2	CAGCCGGAGA	TTCAGATCCT	CAAAGCACTG	CACACTGATT	TCATTGTCAA	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	525

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

ADNc de JAK3 hum; U09607	GTATCGTGGT	GTCAGTATG	GCCCCGGCCG	GCCAGAG-CT	GCGGCTGGTC	2798
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	GTATCGTGGT	GTCAGTATG	GCCCCGGCCG	-CCAGAGCCT	GCGGCTGGTC	574
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	
ADNc de JAK3 hum; U09607	ATGGAGTACC	TGCCCCAGCG	CTGCTTGCGC	GACTTCCTGC	AGCGGCACCG	2848
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	ATGGAGTACC	TGCCCCAGCG	CTGCTTGCGC	GACTTCCTGC	AGCGGCACCG	624
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-TGCTTGCGC	GAGTTCCTGC	AGCGGCACCG	29
ADNc de JAK3 hum; U09607	CGCGCGCCTC	GATGCCAGCC	GCCTCCTTCT	CTATTCCCTCG	CAGATCTGCA	2898
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	CGCGCGCCTC	GATGCCAGCC	GCCTCCTTCT	CTATTCCCTCG	CAGATCTGCA	674
Cebador 1 del clon 3 - 2	CGCGCGCCTC	GATGCCAGCC	GCCTCCTTCT	CTATTCCCTCG	CAGATCTGCA	79
ADNc de JAK3 hum; U09607	AGGSCATGGA	GTACCTGGGC	TCCCGCGGCT	GCGTGCACCG	CGACCTGGCC	2948
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	AGGSCATGGA	GTACCTGGGC	TCCCGCGGCT	GCGTGCACCG	CGACCTGGCC	724
Cebador 1 del clon 3 - 2	AGGSCATGGA	GTACCTGGGC	TCCCGCGGCT	GCGTGCACCG	CGACCTGGCC	1.29
ADNc de JAK3 hum; U09607	GCCCGAAACA	TCCTCGTGA	GAGCGAGGC-	ACACGTCAGG	-ATCG-CTGA	2995
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	-----	-----	-----	-----	
Clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	38
Cebador 1 del clon 3 - 2	-----	-----	-----	-----	-----	760

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

Complemento del cebador del clon 3 - 2	GCCCGAACA TCCTCTGGA GAGCGAGGCT GCACGTCAAG CATCGACTGA	774
Cebador 1 del clon 3 - 2	GCCCGAACA TCCTCTGGA GAGCGAGGCT ACACGTCAAG -ATCG-CTGA	176
ADNc de JAK3 hum; U09607	CTTCGGCCTA GCTAAGCTGC TGCCGCTTGA CAAGACTAC TACGTGGTCC	3045
Complemento del clon 3 - 2 KS	CTTCGGCCTA GCTAAGCTGC TGCCGCT-GA CAAGACTAC TACGTGGTCC	86
Complemento del cebador del clon 3 - 2	CTTCGGCCTA GCTA-GATGC TG-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	CTTCGGCCTA GCTAAGCTGC TGCCGCTTGA CAAGACTAC TACGTGGTCC	795 226
ADNc de JAK3 hum; U09607	GCGAGCCAGG CCAGAGCCCC ATTTTCTGGT ATGCCCCCGA ATCCCTCTCG	3095
Complemento del clon 3 - 2 KS	GCGAG-CAGG CCAGAGCCCC ATTTTCTGGT ATGCCCCCGA ATCCCTCTCG	135
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	GCGAGCCAGG CCAGAGCCCC ATTTTCTGGT ATGCCCCCGA ATCCCTCTCG	795 276
ADNc de JAK3 hum; U09607	GACAACATCT T-CTCTCGCC AGTCAGACGT C-TGGAGCTT CGGGGTCTGC	3143
Complemento del clon 3 - 2 KS	GACAACATCT TTCTCTCGCC AGTCAGACGT CTTGGAGCTT CGGGGTCTGC	185
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	GACAACATCT T-CTCTCGCC AGTCAGACGT C-TGGAGCTT CGGGGTCTGC	795 324
ADNc de JAK3 hum; U09607	CTGTACGAGC TCTTACCTA CTGCGACAAA AGCTGCAGCC CCTCGGCCGA	3193
Complemento del clon 3 - 2 KS	CTGTACGAGC TCTTACCTA CTGCGACAAA AGCTGCAGCC CCTCGGCCGA	235
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	CTGTACGAGC TCTTACCTA CTGCGACAAA AGCTGCAGCC CCTCGGCCGA	795 374

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

Cebador 1 del clon 3 - 2	GGGGAAGCCG GGGGTGTGAG ACTCATGCCT TCACTGCTCA CCCAGAGGEC	624
ADNc de JAK3 hum; U09607		
Complemento del clon 3 - 2 KS	AAACACCACT CCCTGTCCCTT TTCATAGCTC CTGCCCGCAG ACCTCTGGAT	3493
Clon 3 - 2	AAACACCACT CCCTGTCCCTT TTCATAGCTC CTGCCCGCAG ACCTCTGGAT	535
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	AAACACCACT CCCTGTCCCTT TT-ATAGCTC CTGCCCGCAG ACCT-TGGAT	795
		672
ADNc de JAK3 hum; U09607		
Complemento del clon 3 - 2 KS	TAGGTCTCTG TTGACTGGCT GTGTGACCTT AGGCCCGGAG CTGCCCTCT	3543
Clon 3 - 2	TAGGTCTCTG TTGACTGGCT GTGTGACCTT AGGCCCGGAG CTGCCCTCT	585
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	TAGGTCTCTG TTGACTGGCT GTGTGACCTT AGGCCCGGAG CTGCCCTCT	795
		721
ADNc de JAK3 hum; U09607		
Complemento del clon 3 - 2 KS	CTGGSCCTCA GAGGCCCTTAT GAGGGTCTC TACTTCAGGA ACACCCCAT	3593
Clon 3 - 2	CTGGSCCTCA GAGGCCCTTAT GAGGGTCTC TACTTCAGGA ACACCCCAT	635
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	CTGGGC-TCA AAG--CCTAT GAGGGT-CTC TACTTCAG-A ACA-CCCAT	795
		765
ADNc de JAK3 hum; U09607		
Complemento del clon 3 - 2 KS	GACATTGCAT TTGGGGGGGC TCCCGTGGCC TGTAAGATAG CCTGTGGCCT	3643
Clon 3 - 2	GACATTGCAT TTGGGGGGGC TCCCGTGGCC TGTAAGATAG CCTGTGGCCT	685
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	760
Cebador 1 del clon 3 - 2	GACATTGCAT TTG-----	795
		778
ADNc de JAK3 hum; U09607		
	TTGCAATTG TTAAGTTCA AGACAGATGG GCATATGTGT CAGTGGGCT	3693

FIGURA 3

JAK3 U09607 frente a un clon de ADNc de condrocitos humanos

ADNc de JAK3 hum; U09607	ACCTCTGCTT CCCAGGTTCA AGCGATTCTC CTGCCTCAGC CTCCCGAGTA	3943
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	811
Clon 3 - 2	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	795
Cebador 1 del clon 3 -	-----	778
ADNc de JAK3 hum; U09607	GCTGGGATTA CAGGTGTGCA CCACCACACC CGGCTAATTT TTTTATATTT	3993
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	811
Clon 3 - 2	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	795
Cebador 1 del clon 3 -	-----	778
ADNc de JAK3 hum; U09607	TAATAGAGAT GAGGTTTCAC CATGATGCCC AGGCTGATCT CGAACTCCTA	4043
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	811
Clon 3 - 2	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	795
Cebador 1 del clon 3 -	-----	778
ADNc de JAK3 hum; U09607	ACCTCAAGTG ATCCTCCCAC C	4064
Complemento del clon 3 - 2 KS	-----	811
Clon 3 - 2	-----	760
Complemento del cebador del clon 3 - 2	-----	795
Cebador 1 del clon 3 -	-----	778

FIGURA 3

Niveles de ARNm de Jak3 en condrocitos humanos secundarios

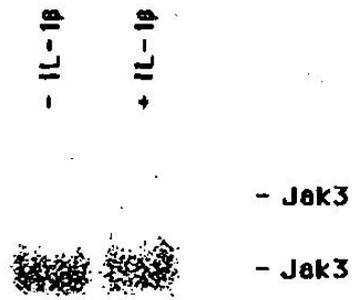
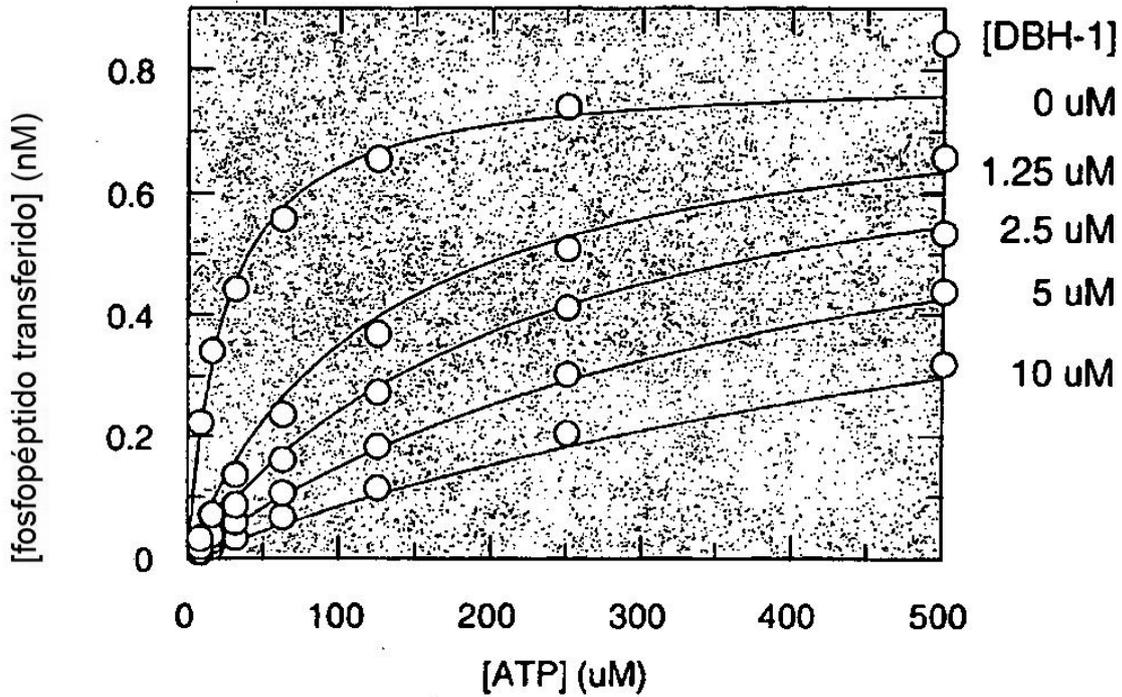


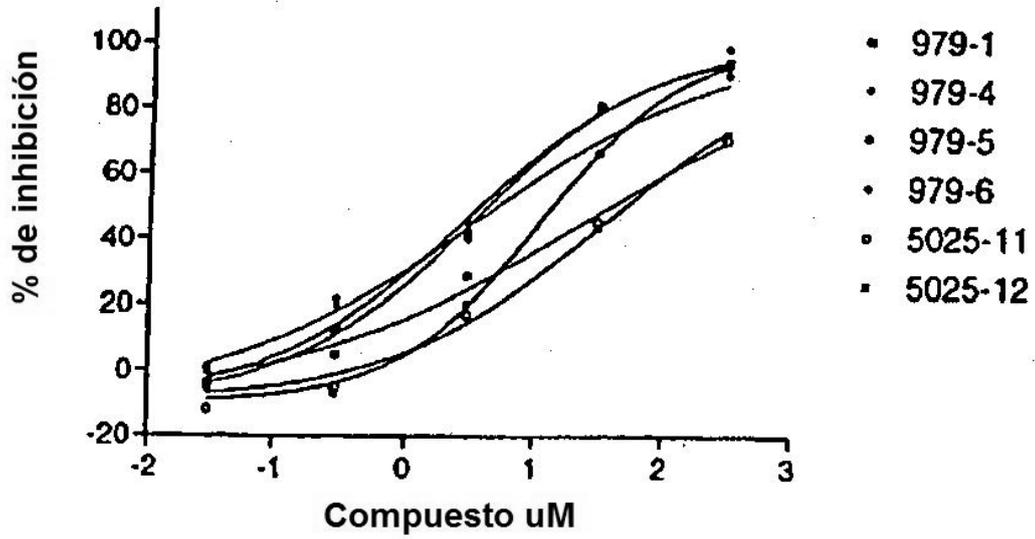
FIGURA 4

Inhibición de la tirosina cinasa JAK3 a través de DBH-1

La inhibición con DBH-1 de JAK3 es competitiva con ATP, con una constante de inhibición (K_i) de 286 ± 16 nM. DBH-1 interacciona con el bolsillo de unión a ATP de JAK3.

FIGURA 5

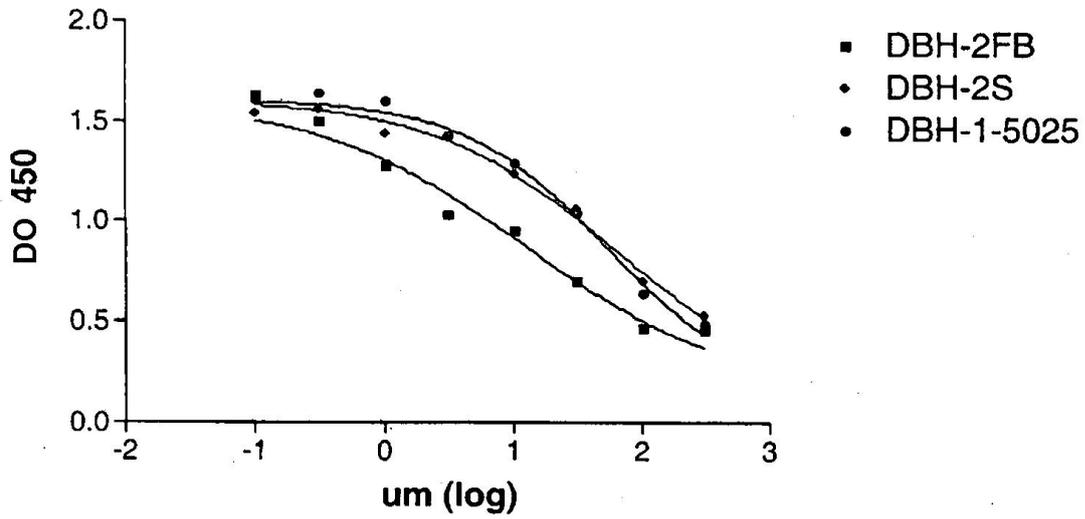
ELISA DE JAK
6 de noviembre, 1997



	Hill	ec-50
979-1	0.6165	3.108
979-4	0.4425	3.319
979-5	0.7872	10.70
979-6	0.5832	2.640
5025-11	0.5129	34.43
5025-12	0.3763	23.40

FIGURA 6

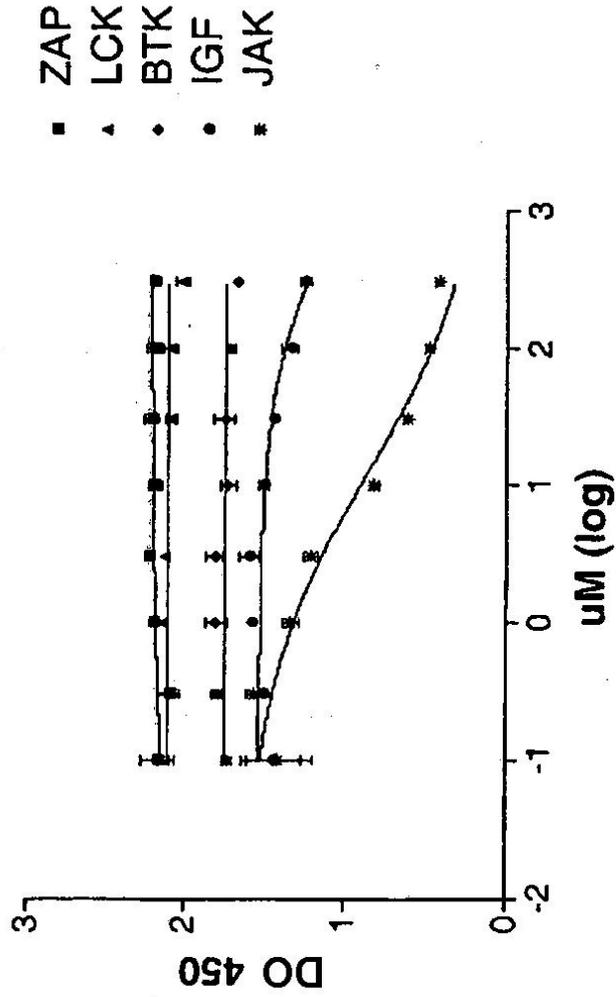
**ELISA poli-glu-tyr de JAK
20 de julio, 1998**



	DBH-2FB	DBH-2S	DBH-1-5025
PENDIENTE DE HILL	-0.5458	-0.6365	-0.7951
EC50	11.60	53.99	49.69

FIGURA 7A

DBH-2FB
7 de julio, 1998



	ZAP	LCK	BTK	IGF	JAK
PENDIENTE DE HILL:	0.3488	-0.9997	-1.000	-0.7071	-0.5562
EC50	5.933e-006	3.377e+009	1.567e+020	1971	11.89

FIGURA 7B

Inhibición con DBH de ARNm inducidos con IL-1 β en condrocitos humanos secundarios

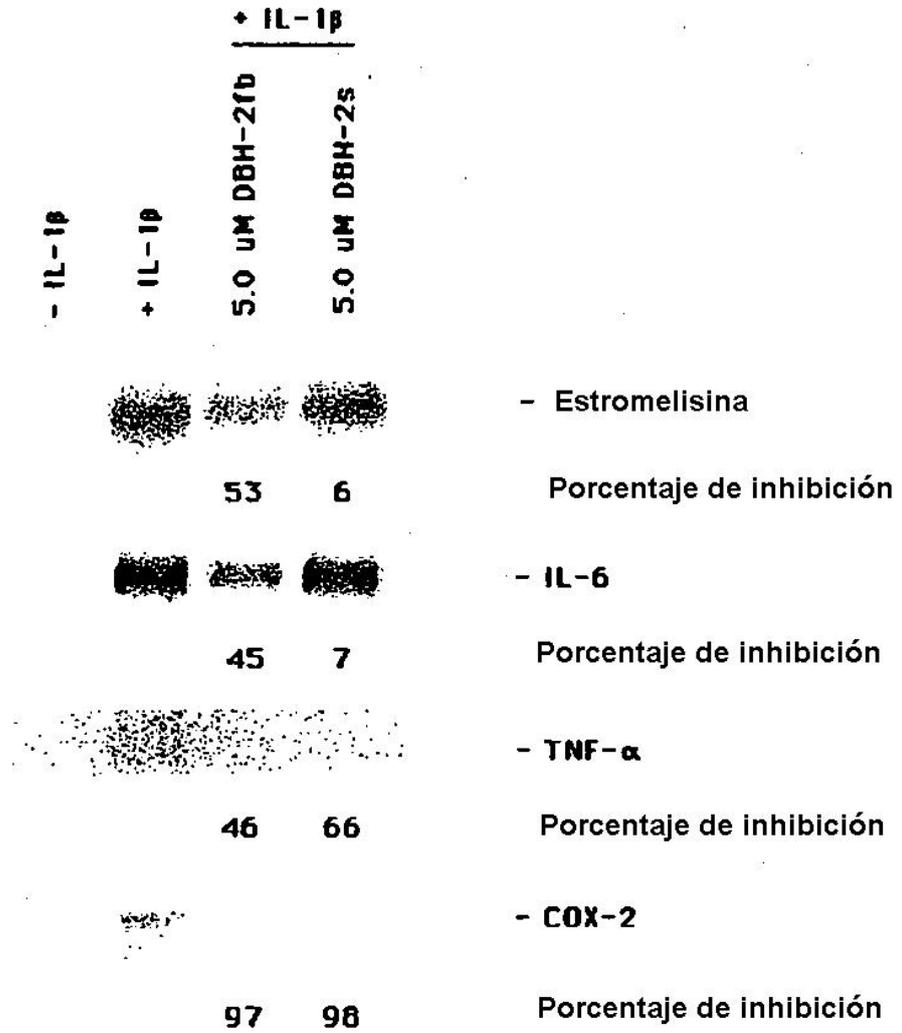


FIGURA 8A

Inhibición de ARNm inducidos con IL-1 β en condrocitos humanos secundarios

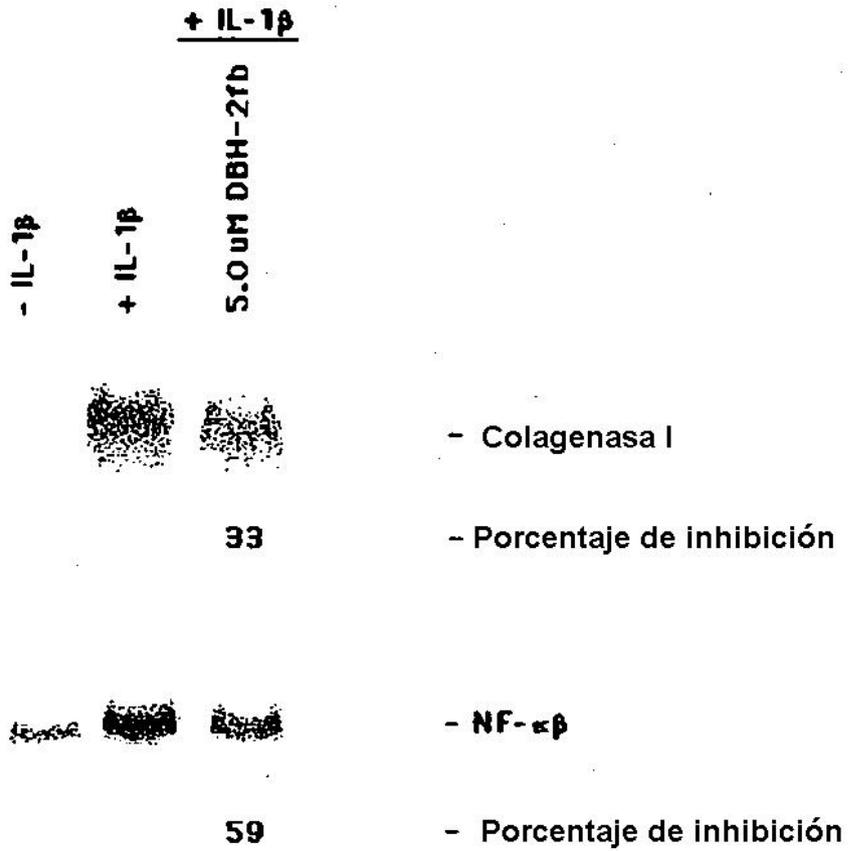


FIGURA 8B

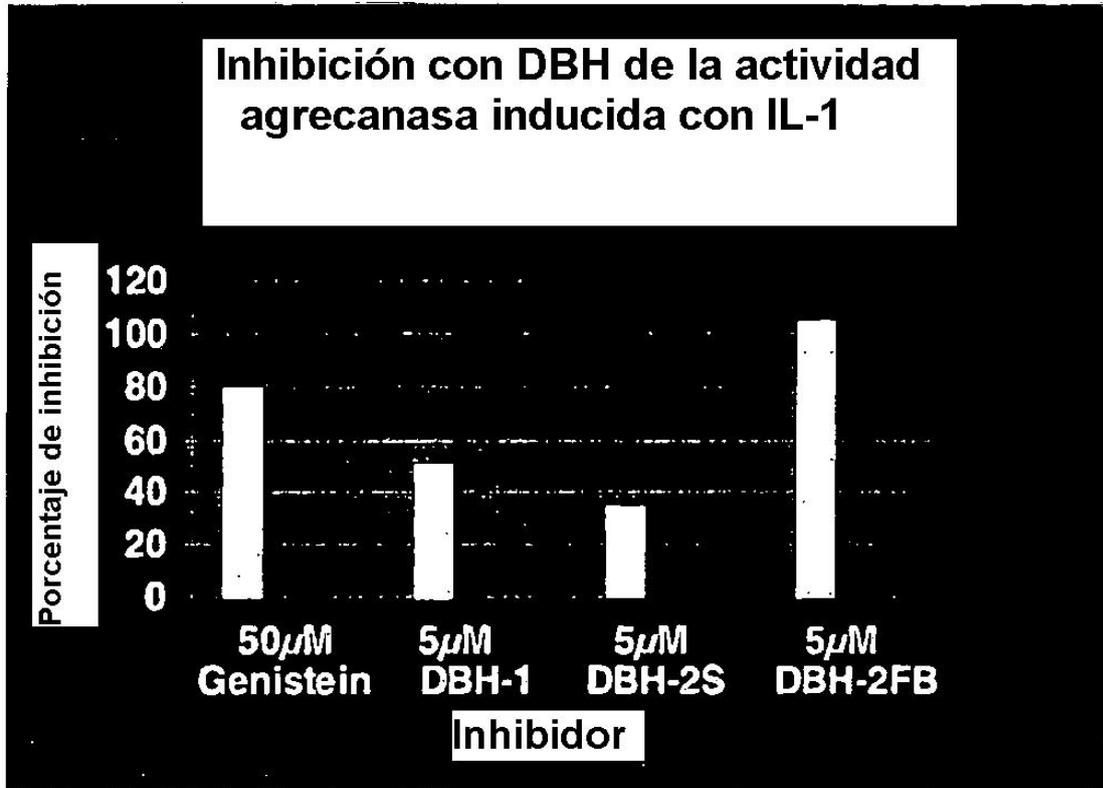


FIGURA 9

Inhibición de ARNm inducidos con IL-1 β en condrocitos humanos secundarios

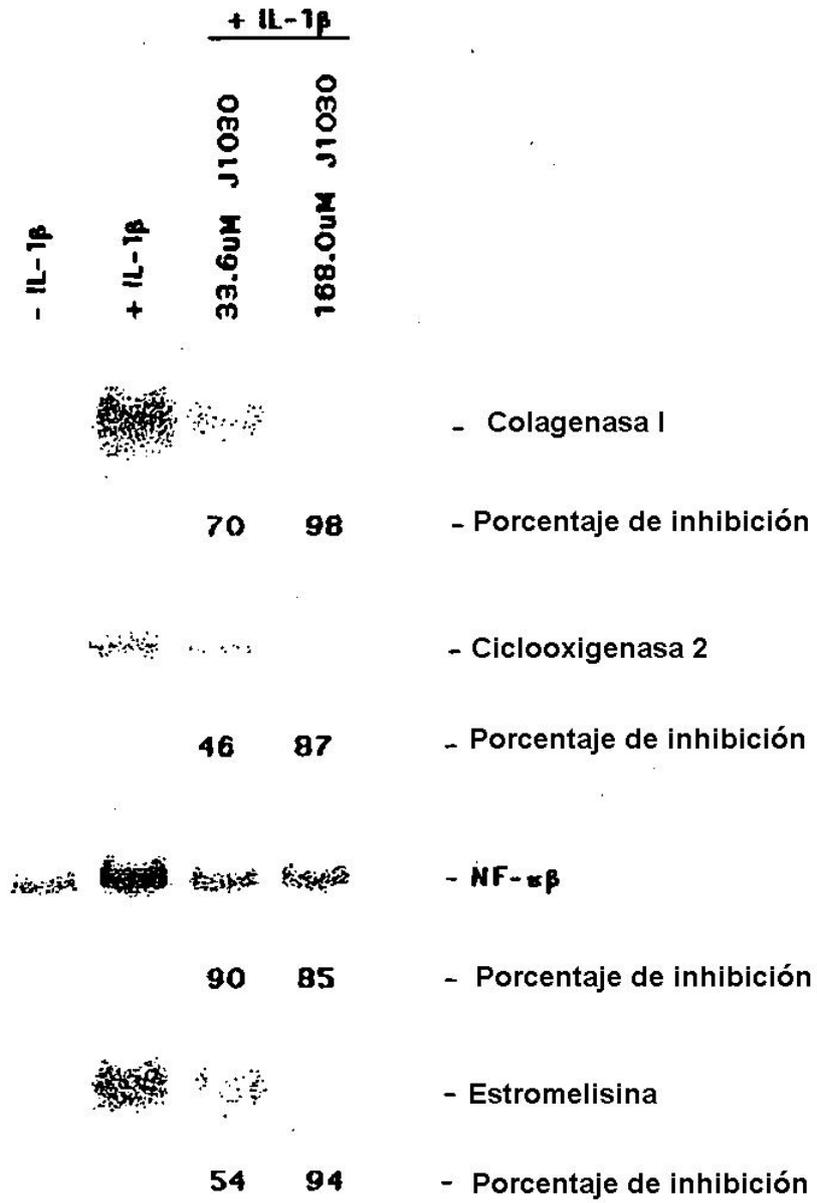


FIGURA 10