

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 554**

51 Int. Cl.:

A61P 17/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2011** **PCT/US2011/059029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012** **WO12061537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011** **E 11838771 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 2635299**

54 Título: **Métodos para tratar los trastornos de pérdida de cabello**

30 Prioridad:

02.11.2010 US 409509 P

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

06.03.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 Low Memorial Library, 535 West 116th Street
New York, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

**CHRISTIANO, ANGELA, M. y
CLYNES, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 746 554 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 tratar los trastornos de pérdida de cabello

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/409.509, que fue presentada el 2 de noviembre de 2010.

Antecedentes de la invención

- 10 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. La Alopecia Areata (AA) es una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes, que conduce a la pérdida de cabello debido al colapso del privilegio inmune del folículo piloso y la posterior destrucción autoinmune. La AA es una enfermedad de la piel que conduce a la pérdida de cabello en el cuero cabelludo y en otros lugares. En algunos casos graves, puede progresar hasta completar la pérdida de cabello en la cabeza o el cuerpo. Aunque se cree que la alopecia areata es causada por la autoinmunidad, rara vez se informa el diagnóstico y el tratamiento del nivel genético. La base genética de la AA es en gran medida desconocida.

Resumen de la invención

- 20 Un aspecto de la invención abarca un inhibidor de Jak1 y/o Jak2 seleccionado del grupo que consiste en: AG490 con el número CAS 133550-30-8; CYT387 con el número CAS 1056634-68-4; SB1518 con el número CAS 937272-79-2; TG101348 con el número CAS 936091-26-8; BMS-911543 con el número CAS 1271022-90-2; WP-1034 con el número CAS 857064-42-7; CEP-701 con el número CAS 111358-88-4; INCB 018424 con el número CAS 941678-49-5; y LY3009104 con el número CAS 1187594-09-7 para uso en el tratamiento de un trastorno de pérdida de cabello
- 25 seleccionado del grupo que consiste en alopecia areata y alopecia androgenética en un mamífero que lo necesite. La divulgación se refiere a un inhibidor que es un inhibidor de Stat1 y/o un inhibidor de Stat2. En una realización adicional, el inhibidor es INCB 018424. El Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la invención, en donde el tratamiento se logra induciendo el crecimiento del cabello en el sujeto, la divulgación se refiere a trastornos de pérdida de cabello que comprenden efluvio telógeno, tiña de la cabeza, hipotricosis o hipotricosis simple hereditaria. En una realización, el
- 30 Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la invención, en donde la alopecia areata es alopecis universalis o alopecia total. En una realización, el Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la invención, que comprende además la etapa (b) determinar si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes de tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak1 o Jak2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak1 o Jak2; o una molécula pequeña. La divulgación se refiere a un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat1 o Stat2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat1 o Stat2; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490 con el número CAS 133550-30-8; CYT387 con el número CAS 1056634-68-4; SB1518 con el número CAS 937272-79-2; TG101348 con el número CAS 936091-26-8; BMS-911543 con el número CAS 1271022-90-2; WP-1034 con el número CAS 857064-42-7; CEP-701 con el número CAS 111358-88-4; INCB 018424 con el número CAS 941678-49-5; y LY3009104 con el número CAS 1187594-09-7. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25(3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8.
- 45 En algunas realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Jak1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 11. La divulgación se refiere a un ARNsi dirigido a un gen Stat1 que es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 12.

- 50 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de una proteína tirosina quinasa (PTK) implicada en la señalización de citoquinas. En una realización, el inhibidor es un inhibidor Jak/Stat. En otras realizaciones, el inhibidor es INCB 018424. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak1 o Jak2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak1 o Jak2; o una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat1 o Stat2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat1 o Stat2; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490, CYT387, SB1518, LY3009104, TG101348, BMS-911543 o CEP-701. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25(3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una

secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8. En algunas realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Jak1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 11. En otras realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Stat1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 12.

5 La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Jak1. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el trastorno de pérdida de
10 comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto
15 afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak1; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak1; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490, CYT387, SB1518, LY3009104, TG101348, BMS-911543 o CEP-701. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Jak1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 11.

20 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de Jak1, controlando así el crecimiento del cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de cabello. En otras
25 realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el
30 sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak1; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak1; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490, CYT387, SB1518, LY3009104, TG101348, BMS-911543 o CEP-701. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Jak1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 11.

35 La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Jak 2. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el trastorno de pérdida de
40 comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del
45 tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak2; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490, CYT387, SB1518, LY3009104, TG101348, BMS-911543 o CEP-701. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 4.

50 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Jak 2, controlando así el crecimiento del cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de cabello. En otras
55 realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el
60 sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Jak2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Jak2; o una molécula pequeña. En una realización, la molécula pequeña es AG490, CYT387, SB1518, LY3009104, TG101348, BMS-911543 o CEP-701. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 4.

65 La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Stat 1. En una realización, el inhibidor es un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat1; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat1; o una molécula pequeña. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25 (3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 6. En otras realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Stat1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 12.

La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Stat 1, controlando así el crecimiento del cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat1; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat1; o una molécula pequeña. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25(3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 6. En otras realizaciones, el ARNsi dirigido a un gen Stat1 es cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 12.

La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Stat 2. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 7. En otra realización, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat2; o una molécula pequeña. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25 (3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 8.

La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Stat 2, controlando así el crecimiento del cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis. En una realización, el método comprende además la etapa (b) que determina si el inhibidor administrado indujo el crecimiento del cabello en el sujeto afectado con un trastorno de pérdida de cabello en comparación con el crecimiento del cabello del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor. En una realización, el inhibidor es un ARN antisentido que inhibe específicamente la expresión del gen que codifica la proteína Stat2; un ARNsi que se dirige específicamente al gen que codifica la proteína Stat2; o una molécula pequeña. En otra realización, la molécula pequeña es WP-1034 (Faderl et al., Anticancer Res. 2005 May-Jun; 25(3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) o hiperforina. En otra realización, el ARNsi se dirige a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende la SEQ ID NO: 8.

En una realización adicional, el inhibidor de Jak1 y/o Jak2 está en una composición adecuada para inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa; una infusión administración oral, nasal, intradérmica, subcutánea, transmucosa, rectal o tópica; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la

administración ocurre diariamente, semanalmente, dos veces a la semana, mensualmente, dos veces al mes o anualmente.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 son imágenes fotográficas de manifestaciones clínicas de AA. En los paneles superiores (Figuras 1A-B), pacientes con AA multiplex. En la Figura 1B, el paciente está en fase de nuevo crecimiento. Para los pacientes con alopecia universal, existe una falta total de vello corporal y del cuero cabelludo (Figura 1C), mientras que los pacientes con alopecia total solo carecen de pelo del cuero cabelludo (Figura 1D). En la Figura 1D, el crecimiento del cabello se observa en la región parietal, mientras que no es evidente el crecimiento en las regiones occipitales o temporales.
- 10 La Figura 2 muestra un diagrama que muestra la respuesta inflamatoria subyacente a la alopecia areata (AA).
- La Figura 3 muestra un diagrama que muestra la respuesta inflamatoria subyacente a la alopecia areata (AA).
- 15 La Figura 4A es una fotografía de ganglios linfáticos y bazo aislados de ratones C3H afectados con AA (arriba) y ratones de control (abajo).
- La Figura 4B muestran los resultados del análisis FACS de que NKG2D con células CD8 y Th1 se expanden en los ganglios linfáticos cutáneos AA murinos.
- 20 La Figura 4C es un gráfico de barras que muestra un aumento de 6 veces en el número de células productoras de citoquinas en ratones C3H afectados con AA en comparación con los ratones de control.
- 25 La Figura 5A es una firma de ARN de piel alopecica en ratones C3H. El mapa de calor muestra que 16 de los 20 genes no regulados principales son genes de respuesta al interferón. 16 de los 20 principales genes regulados al alza son genes sensibles al interferón (IFN- γ pero no los IFN de tipo I están elevados).
- La Figura 5B muestra el perfil transcripcional de la piel con AA. La verificación de qPCR de genes individuales seleccionados de la lista generada muestra un cambio de pliegue promedio en 3 experimentos.
- 30 La Figura 6 es un diagrama que muestra los objetivos en AA.
- La Figura 7 muestra un diagrama que muestra la ruta del interferón γ .
- 35 Las Figuras 8A-B muestran dos metodologías de mapeo de genes. La Figura 8A muestra el análisis de ligamiento en familias. La Figura 8B muestra análisis de asociación en una cohorte de población.
- La Figura 9 muestra un estudio de asociación de Genomewide (GWAS) en AA.
- 40 Las Figuras 10A-B muestran señales de peligro: expresión de ULBP3 en el folículo piloso tanto en individuos de control (Figura 10A) como en pacientes con AA (figura 10B).
- Las Figuras 11A-B muestran que la AA es causada por un "enjambre de abejas": las células T CD8 asesinas atraídas por NKG2DL. La Figura 11A muestra un enjambre de abejas "anterior a 2010" en AA. La Figura 11B muestra la identificación "2012" de las abejas ((m) tinción de CD8; (n) tinción de NKG2D y (o) colocalización de NKG2D y CD8).
- 45 La Figura 12 muestra un diagrama que muestra la respuesta inflamatoria subyacente a AA.
- 50 La Figura 13 muestra INCB18424-202: los marcadores de transcripción Th1 y Th17 y la queratina 16 disminuyen con INCB 18424 tópico, un tratamiento con inhibidores de JAK1 y JAK2.
- La Figura 14 muestra los resultados del puntaje total de lesiones clave para la INCB 18424-203. Los resultados muestran cómo ese puntaje de lesión total para todos los grupos de dosis $\geq 2x$ disminuye con respecto al vehículo, logrando importancia después del control para la multiplicidad.
- 55 Las Figuras 15A-B muestran que el tratamiento con INCB018424 reduce notablemente el engrosamiento epidérmico y la inflamación dérmica. No se observa adelgazamiento patológico de la piel.
- 60 La Figura 16 es un esquema que muestra que las estrategias preclínicas para interrumpir la patogénesis de AA tienen como objetivo la interrupción de la inducción y la función efectora de las células T CD8 e incluyen el bloqueo de las señales de IFN- γ .
- La Figura 17 muestra que las células T CD8⁺ NKG2D⁺ se infiltran en los folículos pilosos AA en ratones y humanos. Panel superior: Alopecia humana Areata (Pethukova et al., 2010, Nature, 466(7302): 113-7); panel inferior-C3H/HeJ Alopecia Areata.
- 65

La Figura 18 muestra células T CD8+NKG2D+ en ratones C3H alopecicos. Las células T CD8 $\alpha\beta$ +NKG2D+ se expanden masivamente en la piel, ganglios linfáticos y sangre de ratones C3H alopecicos. (Las células T NKG2D+ $\gamma\delta$ están presentes en la piel afectada y no afectada).

5 La Figura 19 muestra células T CD8+NKG2D+ en ratones alopecicos C3H. El inmunofenotipo de las poblaciones LN CD8 α +NKG2D+ cerradas muestra que son uniformemente células T de memoria productoras de CD8 $\alpha\beta$ +CD44+CXCR3+DX5+NKG2A/C/E+IFN- γ .

10 La Figura 20 muestra un análisis de tipo de espectro de células T C3H en piel y LN: repertorios de TCR similares son compartidos por la piel total y las células T CD8+NKG2D+ LN clasificadas identificando estos como los efectores relevantes.

15 Las Figuras 21A-B muestran que las células T CD8 productoras de IFN- γ dominan el AA humana y de ratón. La Figura 21A: Humano: las células T obtenidas a partir del rastreo de células T de biopsias de piel con AA son uniformemente CD8+NKG2D+ y producen IFN- γ tras la estimulación con PMA/Ionomicina. La Figura 21B: Ratón: las células de los ganglios linfáticos estimulados por C3H/HeJ de ratones alopecicos contienen 3 veces más células T CD8 y CD4 productoras de IFN- γ que los ratones no afectados.

20 La Figura 22 muestra que los IFN Tipo I y II están regulados positivamente en la piel con AA de ratón C3H: aumenta los cambios en la expresión de genes de interferón (normalizados a 18S) entre 3 ratones C3H/HeJ afectados y 3 no afectados, utilizando una señal de interferón y una matriz de respuesta qPCR (Stellarray Lonza Cat #00189608).

25 La Figura 23 muestra gráficos que muestran quimioquinas y citoquinas séricas elevadas en AA humana. Las quimioquinas inducidas por interferón y IFN (por ejemplo, IP-10/CXCL10) están elevadas en el suero de AA humana, en algunos casos se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, es decir, enfermedad irregular (AAP) frente a universalis (AU).

30 La Figura 24 es un análisis de Luminex que muestra IL-13 elevada en el suero de sujetos con AA humanas, en algunos casos correlacionando con la gravedad de la enfermedad, es decir, la enfermedad en parches (AAP) versus universalis (AU).

35 La Figura 25 muestra datos de citometría de flujo que se reunieron en un LSRII utilizando los siguientes mAbs en un tubo para teñir a toda la población de células dérmicas C3H liberadas de un parche de piel alopecica de 0.5 cm por 2 cm después de 30 minutos de digestión con collagenasa: (MHC II, CD11b, CD11c, CD19, 120G8, CD3, CD4, CD8, DX5, NKG2D). Se identifican las células positivas para $\gamma\delta$ NKG2D y la población CD8+DX5+NKG2D+. Estas células también eran CD3+, con una expresión $\gamma\delta$ CD3 100 veces mayor que la observada en las células T CD8+ NK+. >95% del total de células CD3 positivas fueron contabilizadas.

40 La Figura 26 es un gráfico que muestra la evaluación de PBMC de cuatro sujetos con AA. La expresión de NKG2D aumentó en subconjuntos de linfocitos.

45 La Figura 27 muestra espectros en un ratón C3H-HeJ. El ARN se aisló de biopsias de piel y de células T NKG2D- y NKG2D+ CD8+ clasificadas de ganglios linfáticos cutáneos de ratones C3H-HeJ. El análisis de espectrotipificación muestra un sesgo de longitud de CDR3 en varias familias Vbeta. Algunas de las familias sesgadas de Vbeta se comparten entre la piel y las poblaciones de células T CD8+ de ganglios linfáticos NKG2D+ (por ejemplo, Vbeta2, Vbeta5.2, Vbeta20), mientras que las familias Vbeta adicionales están sesgadas en la piel (lo que refleja la población de células T CD4+).

50 La Figura 28 es un esquema que muestra que la piel del cuero cabelludo humano obtenida de individuos de control o afectados por AA puede usarse para establecer cultivos primarios de poblaciones celulares individuales dentro de la piel y el folículo piloso.

55 La Figura 29 muestra un ensayo de 'rastreo' de células T, en el que la dermis humana cultivada obtenida de biopsias de piel perforada se usa como material fuente para el análisis de citometría de flujo. Las biopsias de punción cutánea triseccionada de una biopsia de piel de 6 mm se obtienen de áreas con lesiones alopecicas y sin lesiones. Después de eliminar la grasa, la piel finamente picada se presiona suavemente en una matriz Cellfoam y luego se transfiere, con la piel hacia arriba, a un pozo de una placa de 24 pozos que contiene 2 ml de medio Skin T con IL-2 (6 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml). La profusión de las células T se muestra en la Figura 29A después de retirar la matriz 3 días después.
60 También se muestran la citometría de flujo (Figuras 29B-C) y la espectrotipificación (Figura 29D) de estas células.

La Figura 30 muestra que se cultivaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), paneles superiores o esplenocitos murinos en dosis altas de IL-2 (1000/ml) para generar células asesinas activadas por linfoquina (LAK). Las células LAK marcadas con fluorescencia verde CFSE se incubaron con cultivo de órganos de folículo piloso humano (paneles superiores), o cultivo de folículo piloso de ratón (paneles inferiores) de la región sin lesión (inferior izquierda dos) o con lesión.

La Figura 31 muestra la tinción inmunohistoquímica (IHC) de piel afectada y no afectada con AA en ratones C3H-HeJ.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona métodos para tratar un trastorno de pérdida de cabello (por ejemplo, Alopecia Areata (AA), una forma autoinmune común de pérdida de cabello) con un inhibidor de la vía Jak/Stat, que incluye Jak 1 y Jak 2, Stat 1 y Stat 2. La investigación clínica en AA se ha quedado atrás de sus enfermedades autoinmunes "hermanas" más investigadas en las que este gen ha estado implicado (por ejemplo, artritis reumatoide (AR), diabetes mellitus tipo 1 (T1D), esclerosis múltiple (EM)). La divulgación se refiere a productos terapéuticos no probados previamente en AA que pueden informar sobre la relevancia clínica de esta vía en AA y enfermedades relacionadas.

Descripción general del integumento y las células capilares

El tegumento (o piel) es el órgano más grande del cuerpo y es un órgano altamente complejo que cubre la superficie externa del cuerpo. Se fusiona, en varias aberturas corporales, con las membranas mucosas de los canales alimentarios y otros. El integumento realiza una serie de funciones esenciales, como mantener un ambiente interno constante a través de la regulación de la temperatura corporal y la pérdida de agua; excreción por las glándulas sudoríparas; pero predominantemente actúa como una barrera protectora contra la acción de agentes físicos, químicos y biológicos en tejidos más profundos. La piel es elástica y, a excepción de algunas áreas, como las plantas de los pies, las palmas y las orejas, está unida libremente al tejido subyacente. También varía en grosor de 0.5 mm (0.02 pulgadas) en los párpados ("piel delgada") a 4 mm (0.17 pulgadas) o más en las palmas y las plantas ("piel gruesa") (Ross MH, Histology: A text and atlas, 3a edición, Williams and Wilkins, 1995: Capítulo 14; Burkitt HG, et al, Wheater's Functional Histology, 3a edición, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

La piel está compuesta de dos capas: a) la epidermis y b) la dermis. La epidermis es la capa externa, que es relativamente delgada (0.1 mm). Tiene varias células de espesor y se compone de 5 capas: el estrato germinativo, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido (que se limita a la piel gruesa) y el estrato córneo. La capa epidérmica más externa (el estrato córneo) consiste en células muertas que se desprenden constantemente de la superficie y son reemplazadas desde abajo por una sola capa basal de células, llamada estrato germinativo. La epidermis está compuesta predominantemente por queratinocitos, que constituyen más del 95% de la población celular. Los queratinocitos de la capa basal (estrato germinativo) se dividen constantemente, y las células hijas posteriormente se mueven hacia arriba y hacia afuera, donde experimentan un período de diferenciación, y finalmente se desprenden de la superficie. La población celular restante de la epidermis incluye células dendríticas como las células de Langerhans y los melanocitos. La epidermis es esencialmente celular y no vascular, y contiene poca matriz extracelular, excepto la capa de colágeno y otras proteínas debajo de la capa basal de queratinocitos (Ross MH, Histology: A text and atlas, 3rd edition, Williams and Wilkins, 1995: Capítulo 14; Burkitt HG, et al, Wheater's Functional Histology, 3rd Edition, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

La dermis es la capa interna de la piel y está compuesta por una red de material extracelular colagenoso, vasos sanguíneos, nervios y fibras elásticas. Dentro de la dermis hay folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas (conocidas colectivamente como la unidad pilosebácea) y las glándulas sudoríparas. La interfaz entre la epidermis y la dermis es extremadamente irregular y desigual, excepto en la piel delgada. Debajo de las células epidérmicas basales a lo largo de la interfaz epidérmica-dérmica, la matriz extracelular especializada está organizada en una estructura distinta llamada membrana basal (Ross MH, Histology: A text and atlas, 3rd edition, Williams and Wilkins, 1995: Capítulo 14; Burkitt HG, et al, Wheater's Functional Histology, 3rd Edition, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

La fibra capilar de los mamíferos está compuesta de células queratinizadas y se desarrolla a partir del folículo piloso. El folículo piloso es una clavija de tejido derivada del crecimiento de la epidermis, que se encuentra inmediatamente debajo de la superficie de la piel. La parte distal del folículo piloso está en continuación directa con la epidermis cutánea externa. Aunque es una estructura pequeña, el folículo piloso comprende un sistema altamente organizado de capas reconociblemente diferentes dispuestas en series concéntricas. Los folículos pilosos activos se extienden hacia abajo a través de la dermis, la hipodermis (que es una capa suelta de tejido conectivo) y hacia la capa de grasa o adiposa (Ross MH, Histology: A text and atlas, 3rd edition, Williams and Wilkins, 1995: Capítulo 14; Burkitt HG, et al, Wheater's Functional Histology, 3rd Edition, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

En la base de un folículo piloso activo se encuentra el bulbo piloso. El bulbo consiste en un cuerpo de células dérmicas, conocido como la papila dérmica, contenido en una copa invertida de células epidérmicas conocida como matriz epidérmica. Independientemente del tipo de folículo, las células epidérmicas germinativas en la base de esta matriz epidérmica producen la fibra capilar, junto con varias capas epidérmicas de soporte. La vaina dérmica más baja es contigua al tallo basal de la papila, desde donde la vaina se curva externamente alrededor de todas las capas epidérmicas de la matriz capilar como una cubierta delgada de tejido. La porción más baja de la vaina dérmica continúa como una manga o tubo a lo largo del folículo (Ross MH, Histology: A text and atlas, 3rd edition, Williams and Wilkins, 1995: Chapter 14; Burkitt HG, et al, Wheater's Histología funcional, 3a edición, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

Los apéndices cutáneos en desarrollo, tales como los folículos pilosos y de plumas, dependen de la interacción entre la epidermis y la dermis, las dos capas de la piel. En el desarrollo embrionario, un intercambio secuencial de información entre estas dos capas apoya una serie compleja de procesos morfogénéticos, lo que da como resultado la formación de estructuras foliculares adultas. Sin embargo, en contraste con las células cutáneas y epidérmicas de la piel en general, ciertas poblaciones de células del folículo piloso, después de la madurez, conservan sus comportamientos de tipo embrionario interactivo, inductivo y biosintético. Estas propiedades pueden derivarse de la naturaleza muy dinámica del folículo productivo cíclico, en el que la remodelación tisular repetida requiere un alto nivel de comunicación interactiva dermoepidérmica, que es vital para el desarrollo embrionario y sería deseable en otras formas de reconstrucción tisular.

La fibra capilar se produce en la base de un folículo activo a una velocidad muy rápida. Por ejemplo, los folículos producen fibras capilares a una velocidad de 0.4 mm por día en el cuero cabelludo humano y hasta 1.5 mm por día en vibrissa o bigotes de rata, lo que significa que la proliferación celular en la epidermis del folículo se encuentra entre las más rápidas en tejidos adultos (Malkinson FD and JT Kearns, *Int J Dermatol* 1978, 17: 536-551). El cabello crece en ciclos. La fase anágena es la fase de crecimiento, en la que hasta el 90% de los folículos pilosos se dice que están en anágeno; el catágeno es la fase involutiva o regresiva que representa aproximadamente el 1-2% de los folículos capilares; y el telógeno es la fase de reposo o inactiva del ciclo, que representa aproximadamente el 10-14% de los folículos capilares. La duración del ciclo varía en diferentes partes del cuerpo.

La formación y el ciclo del folículo piloso se controlan mediante un equilibrio de señales inhibitorias y estimuladoras. Las señales de señalización son potenciadas por factores de crecimiento que son miembros de la familia TGF β -BMP. Un destacado antagonista de los miembros de la familia TGF β -BMP es la follistatina. La follistatina es una proteína secretada que inhibe la acción de varias BMP (como BMP-2, -4, -7 y -11) y activinas al unirse a dichas proteínas, y supuestamente juega un papel en el desarrollo del folículo piloso (Nakamura M, et al., *FASEB J*, 2003, 17(3): 497-9; Patel K *Intl J Biochem Cell Bio*, 1998, 30: 1087-93; Ueno N, et al., *PNAS*, 1987, 84: 8282-86; Nakamura T, et al., *Nature*, 1990, 247: 836-8; Iemura S, et al., *PNAS*, 1998, 77: 649-52; Fainsod A, et al., *Mech Dev*, 1997, 63: 39-50; Gamer LW, et al., *Dev Biol*, 1999, 208: 222-32).

El bulbo terminal profundamente incrustado, donde las interacciones dérmicas-epidérmicas locales impulsan el crecimiento activo de la fibra, es el centro de señalización del folículo piloso que comprende un grupo de células mesenquimales, llamado papila dérmica (DP). Esta misma región también es fundamental para la remodelación del tejido y los cambios en el desarrollo involucrados en la alternancia precisa de la fibra capilar o del apéndice entre las fases de crecimiento y regresión. El DP, un participante clave en estas actividades, parece orquestar el complejo programa de diferenciación que caracteriza la formación de fibra capilar a partir de la fuente primitiva de células epidérmicas germinativas (Oliver RF, *J Soc Cosmet Chem*, 1971, 22: 741-755; Oliver RF y CA Jahoda, *Biology of Wool and Hair* (eds Roger et al.), 1971, Cambridge University Press: 51-67; Reynolds AJ and CA Jahoda, *Development*, 1992, 115: 587-593; Reynolds AJ, et al., *J Invest Dermatol*, 1993, 101: 634-38).

La vaina dérmica más baja (DS) surge debajo del tallo basal de la papila, desde donde se curva hacia afuera y hacia arriba. Esta vaina dérmica entonces recubre externamente las capas de la matriz del cabello epidérmico como una capa delgada de tejido y continúa hacia arriba durante todo el folículo. La vaina de la raíz externa (SRO) derivada de la epidermis también continúa a lo largo del folículo, que se encuentra inmediatamente interno a la vaina dérmica entre las dos capas, y forma una membrana basal especializada denominada membrana vítrea. La vaina de la raíz externa constituye poco más que una monocapa epidérmica en el folículo inferior, pero se vuelve cada vez más gruesa a medida que se acerca a la superficie. La vaina de la raíz interna (IRS) forma un molde para el tallo del cabello en desarrollo. Se compone de tres partes: la capa de Henley, la capa de Huxley y la cutícula, siendo la cutícula la parte más interna que toca el tallo del cabello. La capa de cutícula del IRS tiene un grosor de una sola célula y se encuentra adyacente a la fibra capilar. Se interdigita estrechamente con la capa de la cutícula de la fibra capilar. La capa de Huxley puede comprender hasta cuatro capas de células. La capa Henley del IRS es la capa de células individuales que se extiende adyacente a la capa ORS (Ross MH, *Histology: A text and atlas*, 3rd edition, Williams and Wilkins, 1995: Chapter 14; Burkitt HG, et al, *Wheater's Functional Histology*, 3rd Edición, Churchill Livingstone, 1996: Capítulo 9).

Alopecia areata

La alopecia areata (AA) es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes, que afecta a aproximadamente 4.6 millones de personas solo en los Estados Unidos, incluidos hombres y mujeres en todos los grupos étnicos, con un riesgo de por vida del 1.7% (1) En AA, se desarrolla autoinmunidad contra el folículo piloso, lo que da como resultado una pérdida de cabello sin cicatrices que puede comenzar como parches, que pueden unirse y progresar para cubrir todo el cuero cabelludo (alopecia totalis, AT) o eventualmente todo el cuerpo (alopecia universalis, AU) (Figura 1) AA fue descrita por primera vez por Cornelius Celsus en el año 30 d.C., utilizando el término "opiasis", que significa "serpiente", debido a la sinuosa trayectoria de pérdida de cabello a medida que se extendía lentamente por el cuero cabelludo. Hipócrates usó por primera vez la palabra griega 'alopekia' (sarna de zorro), el término moderno "alopecia areata" fue utilizado por primera vez por Sauvages en su *Nosologica Medica*, publicada en 1760 en Lyon, Francia.

Curiosamente, la AA afecta preferentemente a los folículos pilosos pigmentados en la fase anágena (crecimiento) del ciclo del cabello, y cuando el cabello vuelve a crecer en parches de AA, con frecuencia vuelve a crecer blanco o incoloro. Por lo tanto, el fenómeno del "blanqueamiento repentino del cabello" se atribuye a AA con un inicio agudo, y se ha documentado a lo largo de la historia que ha afectado a varios individuos prominentes en momentos de profundo dolor, estrés o miedo (2). Ejemplos incluyen a Shahjahan, quien tras la muerte de su esposa en 1631 experimentó un blanqueamiento agudo de su cabello, y en su dolor construyó el Taj Mahal en su honor. Sir Thomas More, autor de Utopía, quien en la víspera de su ejecución en 1535 se dijo que se había vuelto "blanco tanto en la barba como en el cabello". Se cree que el blanqueamiento repentino del cabello es el resultado de un ataque agudo sobre los folículos pilosos pigmentados, dejando intactos los pelos blancos.

Varios aspectos clínicos de la AA permanecen sin explicación, pero pueden tener pistas importantes para comprender la patogénesis. La AA ataca los pelos solo alrededor de la base de los folículos pilosos, que están rodeados por densos grupos de linfocitos, lo que da como resultado la aparición patognómica de 'enjambre de abejas' en la histología. Sobre la base de estas observaciones, se postula que se emite una señal en el folículo piloso anágeno pigmentado que invoca una respuesta inmune aguda o crónica contra el extremo inferior del folículo piloso, lo que conduce a la perturbación del ciclo capilar, desprendimiento agudo del cabello, anomalías del tallo del cabello y rotura del cabello. A pesar de estas perturbaciones dramáticas en el folículo piloso, no hay destrucción permanente de órganos y la posibilidad de que vuelva a crecer el cabello permanece si se puede restaurar el privilegio inmune.

A lo largo de la historia, la AA se ha considerado a veces como una enfermedad neurológica provocada por el estrés o la ansiedad, o como resultado de un agente infeccioso, o incluso una disfunción hormonal. El concepto de un mecanismo autoinmune genéticamente determinado como base para AA surgió durante el siglo XX a partir de múltiples líneas de evidencia. Los folículos pilosos AA exhiben un infiltrado inmune con células Th, Tc y NK activadas (3, 4) y hay un cambio de una respuesta de citoquina supresora (Th2) a una autoinmune (Th1). El modelo humanizado de AA, que implica la transferencia del cuero cabelludo del paciente con AA a ratones SCID inmunodeficientes, ilustra la naturaleza autoinmune de la enfermedad, ya que la transferencia de células T del donante causa la pérdida de cabello solo cuando se cultiva conjuntamente con folículo piloso o con homogenato de melanoma humano (5, 6). Las células T reguladoras que sirven para mantener la tolerancia inmune se observan en números más bajos en el tejido AA (7), y la transferencia de estas células a ratones C3H/HeJ conduce a la resistencia a AA (8). Aunque AA ha sido considerado exclusivamente como una enfermedad mediada por células T, en los últimos años se ha postulado un mecanismo adicional de enfermedad. El folículo piloso se define como uno de los pocos sitios inmunes privilegiados seleccionados en el cuerpo, caracterizado por la presencia de barreras de la matriz extracelular para impedir el tráfico de células inmunes, la falta de células presentadoras de antígeno y la inhibición de la actividad de las células NK a través de la producción local de inmunosupresores. factores y niveles reducidos de expresión de MHC clase I (9). Por lo tanto, la noción de un "colapso del privilegio inmune" también se ha invocado como parte del mecanismo por el cual puede surgir AA. El apoyo a una base genética para AA proviene de múltiples líneas de evidencia, incluida la heredabilidad observada en familiares de primer grado (10, 11), estudios de gemelos (12) y, más recientemente, de los resultados de nuestros estudios de vinculación basados en la familia (13). Delamere F M et al., 2008 ("Interventions for alopecia areata.", THE COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS, (2008), No. 2, ISSN 1469-493X, página CD004413) discute los efectos de las intervenciones utilizadas en el manejo de alopecia areata, alopecia total y alopecia universal. En general, ninguna de las intervenciones mostró un beneficio significativo del tratamiento en términos de crecimiento del cabello en comparación con el placebo. Mahe et al., Androgenetic alopecia and microinflammation, International Journal of Dermatology (2000) 39: 576-584A revela una hipótesis que postula el papel de la "microinflamación" y las citoquinas inflamatorias para desencadenar un proceso inflamatorio que finalmente resulta en alopecia androgenética. Foitzik et al, American Journal of Pathology, Volumen 168, Número 3, marzo de 2006, páginas 748-756, enseña que la vía JAK/STAT juega algún papel en la progresión de la alopecia androgenética.

Tratamiento de los trastornos de pérdida de cabello

Esta divulgación se refiere al descubrimiento de que un agente terapéutico conocido, por ejemplo, un inhibidor de una proteína tirosina quinasa (PTK) implicada en la señalización de citoquinas, como las proteínas JAK/STAT Jak 1, Jak2, Stat 1 o Stat 2 (por ejemplo, INCB 018424; Incyte), puede usarse para el tratamiento de trastornos de pérdida de cabello. Ejemplos no limitantes de trastornos de pérdida de cabello incluyen: alopecia androgenética, alopecia areata, efluvio telógeno, alopecia areata, alopecia total y alopecia universal.

Un aspecto de la invención abarca un inhibidor de Jak1 y/o Jak2 seleccionado del grupo que consiste en: AG490 con el No. CAS 133550-30-8; CYT387 con el No. CAS 1056634-68-4; SB1518 con el No. CAS 937272-79-2; TG101348 con el No. CAS 936091-26-8; BMS-911543 con el No. CAS 1271022-90-2; WP-1034 con el No. CAS 857064-42-7; CEP-701 con el No. CAS 111358-88-4; INCB 018424 con el No. CAS 941678-49-5; y LY3009104 con el No. CAS 1187594-09-7 para uso en el tratamiento de un trastorno de pérdida de cabello seleccionado del grupo que consiste en alopecia areata y alopecia androgenética en un mamífero que lo necesite. En una realización adicional, el inhibidor es INCB 018424. En una realización, la alopecia areata es alopecia total o alopecia universal. La divulgación se refiere a un trastorno de pérdida de cabello que comprende efluvio telógeno, tiña de la cabeza, hipotricosis o hipotricosis simple hereditaria.

- Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de una proteína tirosina quinasa (PTK) implicada en la señalización de citoquinas. En una realización, el inhibidor es un inhibidor Jak/Stat. En otras realizaciones, el inhibidor es INCB 018424. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de
- 5 cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis.
- 10 La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Jak1. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el trastorno de pérdida de
- 15 cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal.
- 20 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Jak1, controlando así el crecimiento del
- 25 cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de
- 30 cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis.
- 35 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Jak 2, controlando así el crecimiento del
- 40 cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de
- 45 cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis.
- 50 La divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un inhibidor de Stat 1. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el trastorno de pérdida de
- 55 cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tiña de la cabeza, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal.
- 60 La divulgación se refiere a un método para inducir el crecimiento del cabello en un sujeto en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de Stat 1, controlando así el crecimiento del
- 65 cabello en el sujeto. En una realización, el inhibidor comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el sujeto padece un trastorno de pérdida de
- 70 cabello. En otras realizaciones, el trastorno de pérdida de cabello comprende alopecia androgenética, efluvio telógeno, alopecia areata, efluvio telógeno, tinea capitis, alopecia total, hipotricosis, hipotricosis simple hereditaria o alopecia universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertrichosis.

universal. En algunas realizaciones, el compuesto modulador también puede inhibir el crecimiento del cabello, por lo tanto, puede usarse para el tratamiento de trastornos del crecimiento del cabello, como la hipertriosis.

Métodos de manipulación de ADN y aminoácidos y purificación de los mismos

La presente invención utiliza técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante disponibles para un experto en la materia. Dichas técnicas son bien conocidas por el trabajador calificado y se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach," Volumes I and II (D. N. Glover, ed., 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985); "Transcription and Translation" (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1986); "Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984), y Sambrook, et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (1989).

Un experto en la materia puede obtener una proteína de varias maneras, que incluyen, pero no se limitan a, aislar la proteína por medios bioquímicos o expresar una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés mediante métodos de ingeniería genética.

Una proteína está codificada por un ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ADN sintético, así como cualquier forma de ARN correspondiente). Por ejemplo, puede ser codificado por un ácido nucleico recombinante de un gen. Las proteínas pueden obtenerse de diversas fuentes y pueden producirse según diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína puede obtenerse mediante el rastreo de bibliotecas de ADN o mediante la amplificación de una fuente natural. Una proteína puede ser un fragmento o una porción de la misma. Los ácidos nucleicos que codifican una proteína pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante y dichos ácidos nucleicos recombinantes pueden prepararse mediante técnicas convencionales, que incluyen síntesis química, ingeniería genética, técnicas enzimáticas o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una proteína Jak 1 es el polipéptido codificado por el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de un polipéptido Jak 1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Una proteína Jak 2 es el polipéptido codificado por el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de un polipéptido Jak 2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, una proteína Stat 1 es polipéptido codificado por el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6. Un ejemplo de un polipéptido Stat 1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5. Una proteína Stat 2 es el polipéptido codificado por el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 8. Un ejemplo de un polipéptido Stat 2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7.

La secuencia de polipéptidos de Jak 1 humano se representa en SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de Jak 1 humano se muestra en SEQ ID NO: 2. La información de secuencia relacionada con Jak 1 está accesible en bases de datos públicas mediante números de acceso de GenBank NP_002218 (para proteína) y NM_002227.2 (para ácido nucleico).

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje humano correspondiente a Jak1 (residuos 1 - 1154):

```

1  MQYLNLIKEDC  NAMAFCAMR  SSKKTEVNLE  APEPGVEVIF  YLSDREPLRL  GSGEYTAEEL
61  CIRAAQACRI  SPLCHNLFAL  YDENTKLWYA  PNRTITVDDK  MSLRLHYRMR  FYFTNWHGNT
121  DNEQSVWRHS  PKKQKNGYEK  KKIPDATPLL  DASSLEYLFA  QGQYDLVKCL  APIRDPKTEQ
181  DGHDIENECL  GMAVLAISHY  AMMKMKQLPE  LPKDISYKRY  IPETLNKSIR  QRNLLTRMRI
241  NNVEFKDFLKE  FNNKTICDSS  VSTHDLKVY  LATLETLTKE  YGAEIFETSM  LLISSENMEN
301  WFHSNDGGNV  LYEVMTGN  LGIQWRHKPN  VVSVEKEKNK  LKRKKLENKH  KKDEEKNKIR
361  EEWNNFSYFP  EITHIVIKES  VVSINKQDNK  KMELKLSSHE  EALSFSVSLVD  GYFRLTADAH
421  HYLCTDVAPP  LIVHNIQNGC  HGPICTEYAI  NKLRQEGSEE  GMYVLRWSCT  DFDNIMLMTVT
481  CFEKSEQVQG  AQKQFKNFQI  EVQKGRYSLH  GSDRSFPSLG  DLMSHLKKQI  LRTDNISFML
541  KRCCQPKPRE  ISNLLVATKK  AQEWQPVPY  SLSFDRILK  KDLVQGEHLG  RGTTRTHIYSG
601  TLMDYKDEGE  TSEEKKIKVI  LKVLDPSHRD  ISLAFPEAAS  MMRQVSHKHI  VYLYGVQVCRD
661  VENIMVEEFV  EGGPLDLFMH  RKSDVLTTPW  KFKVAKQLAS  ALSYLEDKDL  VHGNVCTKNL
721  LLAREGIDSE  CGPFIKLSDP  GIPITVLSRQ  ECIERIPWIA  PECVEDSKNL  SVAADKWSFG
781  TTLWEICYNG  EIPLKDKTLI  EKERFYESRC  RPVTPSCKEL  ADLMTRCMNY  DPNQRPFFRA
841  IMRDINKLEE  QNPDIKSEK  PATEVDPHVF  EKRFLEKRI  LGEGHFGKVE  LCRYDPEGDN
901  TGEQVAVKSL  KPESGGNHIA  DLKKEIEIL  NLYHENIVKY  KGICTEDGGN  GIKLIMEFLP
961  SGSLKEYLPK  NKNKINLKQQ  LKYAVQICKG  MDYLGSRQYV  HRDLAARNVL  VESEHQVKIG
1021  DFGLTKAIET  DKEYYTVKDD  RDSPVFWYAP  ECLMQSKFYI  ASDVWSFGVT  LHELLTYCDS
1081  DSSPMALFLK  MIGPTHGQMT  VTRLVNTLKE  GKRLPCPPNC  PDEVYQLMRK  CWFQPSNRT
1141  SFQNLIEGFE  ALLK

```

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje humano correspondiente a Jak1 (nucleótidos 1-5053), en donde el "ATG" en **negrita subrayado** denota el comienzo del marco de lectura abierto:

```

1  tgcagacagt gcgggcctgc gccagtcctc ggctgtcctc gccgcgaccc ctccctcagcc
61  ctggggcgcg gcacgctggg gcccgcggg gctggccgcc tagcgagcct gccggctcgac
121  cccagccagc gcagcgacgg ggcgctgcct ggcccaggcg cacacggaag tgcgcttctc
181  tgaagtagct ttggaaagta gagaagaaaa tccagtttgc ttcttgagaa acaactggaca
241  gctgaataaa tgcagtatct aaatataaaa gaggactgca atgccatggc tttctgtgct
301  aaaatgagga gctccaagaa gactgagggtg aacctggagg ccctgagacc aggggtggaa
361  gtgatcttct atctgtcgga cagggagccc ctccggctgg gcagtggaga gtacacagca
421  gaggaactgt gcatcagggc tgcacaggca tgccgtatct ctccctcttg tcacaacctc
481  tttgccctgt atgacgagaa caccaagctc tggtagctc caaatcgcac catcacggtt
541  gatgacaaga tgccctccg gctccactac cggatgaggt tctatttcac caattggcat
601  ggaaccaacg acaatgagca gtcagtgtgg cgtcattctc caaagaagca gaaaaatggc
661  tacgagaaaa aaaagattcc agatgcaacc cctctccttg atgccagctc actggagtat
721  ctgtttgctc agggacagta tgatttggtg aaatgcctgg ctccatttcg agacccaag
781  accgagcagg atggacatga tattgagaac gagtgtctag ggatggctgt cctggccatc
841  tcacactatg ccatgatgaa gaagatgcag ttgccagaac tgccaagga catcagctac
901  aagcgatata ttccagaaac attgaataag tccatcagac agaggaaact tctcaccagg
961  atgcggataa ataattgttt caaggatttc ctaaagggaat ttaacaacaa gaccatttgt
1021  gacagcagcg tgtccacgca tgacctgaag gtgaaatact tggctacctt ggaaactttg
1081  acaaaacatt acggtgctga aatatattgag acttccatgt tactgatttc atcagaaaat
1141  gagatgaatt ggtttcatte gaatgacggg ggaaacgttc tctactacga agtgatgggtg
1201  actgggaatc ttggaatcca gtggaggcat aaaccaaagt ttgtttctgt tgaaaaggaa
1261  aaaaataaac tgaagcggaa aaaactggaa aataaacaca agaaggatga ggagaaaaac
1321  aagatccggg aagagtggaa caatTTTTCT tacttccctg aaatcactca cattgtaata
1381  aaggagtctg tggtcagcat taacaagcag gacaacaaga aaatggaaat gaagctctct
1441  tcccacgagg aggccttgct ctttgtgtcc ctggtagatg gctacttccg gctcacagca
1501  gatgcccatc attacctctg caccgacgtg gccccccgt tgatcgtoca caacatacag
1561  aatggctgtc atggtccaat ctgtacagaa tacgccatca ataaattgcy gaagaagga
1621  agcaggaggg ggatgtacgt gctgaggtgg agctgcaccg actttgacaa catcctcatg
1681  accgtcacct gctttgagaa gtctgagcag gtgcagggtg cccagaagca gttcaagaac
1741  tttcagatcg aggtgcagaa gggccgctac agtctgcacg gttcggaccg cagcttcccc
1801  agcttgggag acctcatgag ccacctcaag aagcagatcc tgcgcacgga taacatcagc
1861  ttcagtctaa aacgtgctg ccagcccaag ccccgagaaa tctccaacct gctggtggct
1921  actaagaaag cccaggagtg gcagcccgtc taccatga gccagctgag tttgatcgg
1981  atcctcaaga aggatctggt gcagggcgag caccttgga gaggcacgag aacacacatc
2041  tattctggga cctgatgga ttacaaggat gacgaaggaa cttctgaaga gaagaagata
2101  aaagtgatcc tcaaagtctt agacccagc cacagggata tttccctggc cttcttcgag
2161  gcagccagca tgatgagaca ggtctccac aaacacatcg tgtacctcta tggcgtctgt
2221  gtccgcgacg tggagaatat catggtggaa gaggtttggtg aagggggtcc tctggatctc
2281  ttcatgcacc ggaaaagcga tgtccttacc acaccatgga aattcaaagt tgccaaacag
2341  ctggccagtg cctgagcta cttggaggat aaagacctgg tccatggaaa tgtgtgtact
2401  aaaaacctcc tctggcccg tgagggcatc gacagtgagt gtggccatt catcaagctc
2461  agtgaccccg gcatcccat tacggtgctg tctaggcaag aatgcattga acgaatccca
2521  tggattgctc ctgagtgtgt tgaggactcc aagaacctga gtgtggctgc tgacaagtgg
2581  agctttggaa ccacgctctg ggaaatctgc tacaatggcg agatcccctt gaaagacaag
2641  acgctgattg agaaagagag attctatgaa agccggtgca ggccagtgc accatcatgt
2701  aaggagctgg ctgacctcat gacccgtgc atgaactatg accccaatca gaggccttct
2761  ttccgagcca tcatgagaga cattaataag cttgaagagc agaattccaga tattgtttca
2821  gaaaaaaaac cagcaactga agtggaaccc acacattttg aaaagcgctt cctaaagagg
2881  atccgtgact tgggagaggg ccactttggg aaggttgagc tctgcaggta tgacccgaa
2941  ggggacaata caggggagca ggtggctgtt aaatctctga agcctgagag tggaggtaac

```

```

3001 cacatagctg atctgaaaaa ggaaatcgag atcttaagga acctctatca tgagaacatt
3061 gtgaagtaca aaggaatctg cacagaagac ggaggaaatg gtattaagct catcatggaa
3121 tttctgcctt cggaagcct taaggaatat cttccaaaga ataagaacaa aataaacctc
3181 aaacagcagc taaaatatgc cgttcagatt tgtaagggga tggactatct gggttctcgg
3241 caatacgttc accgggactt ggcagcaaga aatgtccttg ttgagagtga acaccaagtg
3301 aaaattggag acttcggttt aaccaaagca attgaaaccg ataaggagta ttacaccgtc
3361 aaggatgacc gggacagccc tgtgttttgg tatgtctccag aatgtttaat gcaatctaaa
3421 ttttatattg cctctgacgt ctggtctttt ggagtcactc tgcattgagct gctgacttac
3481 tgtgattcag attctagtcc catggctttg ttcttgaaaa tgataggccc aacctatggc
3541 cagatgacag tcacaagact tgtgaatacg ttaaaagaag gaaaacgcct gccgtgccca
3601 cctaactgtc cagatgaggt ttatcaactt atgaggaaat gctgggaatt ccaaccatcc
3661 aatcgacaaa gctttcagaa ccttattgaa ggatttgaag cactttttaa ataagaagca
3721 tgaataacat ttaaattcca cagattatca agtccttctc ctgcaacaaa tgcccaagtc
3781 attttttaaa aatttctaata gaaagaagtt tgtgttctgt ccaaaaagtc actgaactca
3841 tacttcagta catatacatg tataaggcac actgtagtgc ttaatatgtg taaggacttc
3901 ctctttaaat ttggtaccag taacttagtg acacataatg acaacaaaaa tatttgaaag
3961 cacttaagca ctctccttg tggaaagaat ataccaccat ttcattctggc tagttcacca
4021 tcacaactgc attacaaaaa ggggattttt gaaaacgagg agttgaccaa aataatatct
4081 gaagatgatt gcttttccct gctgccagct gatctgaaat gttttgctgg cacattaatc
4141 atagataaag aaagattgat ggacttagcc ctcaaatttc agtatctata cagtactaga
4201 ccatgcattc ttaaaatatt agataccagg tagtatatat tgtttctgta caaaaatgac
4261 tgtattctct caccagtagg acttaaaactt tgtttctcca gtggcttagc tctgttctct
4321 ttgggtgatc actagcacc ctttttgaga aagctgggtc tacatggggg gatagctgtg
4381 gaatagataa ttgtctgcat gtttaattctc aagaactaag cctgtgccag tgctttccta
4441 agcagtatac ctttaatcag aactcattcc cagaacctgg atgctattac acatgctttt
4501 aagaaacgtc aatgtatatc cttttataac tctaccactt tggggcaagc tattccagca
4561 ctgggttttga atgctgtatg caaccagtct gaataccaca tacgctgcac tgttcttaga
4621 ggggtttccat acttaccacc gatctacaag ggttgatccc tgtttttacc atcaatcact
4681 accctgttgt gcaacacttg aaagaccgg ctagaggcac tatggacttc aggatccact
4741 agacagtttt cagtttgctt ggaggtagct gggtaatcaa aaatgtttag tcattgatcc
4801 aatgtgaacg attacggtct ttatgaccaa gactctgaaa atctttttgt tatgctgttt
4861 agtattcgtt tgatattgtt acttttcacc tgttgagccc aaattcagga ttgggttcagt
4921 ggcagcaatg aagttgccat ttaaatttgt tcatagccta catcaccaag gtctctgtgt
4981 caaacctgtg gccactctat atgcactttg tttactcttt atacaaataa atatactaaa
5041 gactttacat gca

```

La secuencia de polipéptidos de Jak 2 humano se representa en SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos de Jak 2 humano se muestra en SEQ ID NO: 4. La información de secuencia relacionada con Jak 2 está accesible en bases de datos públicas mediante números de acceso de GenBank NP_004963 (para proteína) y NM_004972.3 (para ácido nucleico).

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje humano correspondiente a Jak2 (residuos 1 - 1132):

```

1  MGMTCLTMT EGTSTSSYI QNGDISGNAN SMKQIDPVLQ VVLYHSLGKS EADYLTFPSG
61  EYVAEEICIA ASKACGIPV YHNMFALMSE TERIWYPPNH VFHIDESTRH NVLYRIRFYF
121 PRWYCSGSNR AYRHGISRGA EAPLLDDFVM SYLFAQWRHD FVHGWIQVPV THETQEECLG
181 MAVLDMRIA KENDQTPAI YNSISYKTF PKCIRAKIQD YHILTRKIR YRFRFIQQF
241 SQCKATARNL KLKYLINLE LQSAFYTEKF EVKEPGSGPS GEEIFATIII TGNGGIQWSR
301 GKHKESETLT EQDLQLYCDF PNIIDVSIKQ ANQEGSNESR VVTIHKQDGK NLEIELSSLR
361 EALSFVSLID GYYRLTADAH HYLCKEVAPP AVLENIQSNH HGPISMDFAI SKLKKAGNQT
421 GLYVLRCSPI DFNKYFLTFA VERENVIEYK HCLITKNENE EYNLSGTTKN FSSKDLLNC
481 YQMETVRSDN IIFQFTKCCP PKPKDKSNLL VFRTNGVSDV PTSPTLQRP HTMNQMVFHKI
541 RNEDLIFNES LGQGTFTKIF KGVRRVVDY GQLHETEVLL KVLDKAHRNY SESFFEAASM

```

601 MSKLSHKHLV LNYGVCVCGD ENILVQEFVK FGSLDTYLKK NKNCINILWK LEVAKQLAWA
 661 MHFLEENTLI HGNVCAKNIL LIREEDRKTG NPPFIKLSDP GISITVLPKD ILQERIPWVP
 721 PECIENPKNL NLATDKWSFG TTLWEICSGG DKPLSALDSQ RKLQFYEDRH QLPAPKWAEL
 781 ANLINNCMDY EPDFRPSFRA IIRDLNSLFT PDYELLTEND MLPNMRIGAL GFSGAFEDRD
 841 PTQFEERHLK FLQQLGKGNF GSVEMCRYDP LQDNTGEVVA VKKLQHSTEE HLRDFEREIE
 901 ILKSLQHDNI VKYKGVCYSA GRRNLKLIME YLPYGSRLDY LQKHKERIDH IKLLQYTSQI
 961 CKGMEYLGTK RYIHRDLATR NILVENENRV KIGDFGLTKV LPQDKEYYKV KEPGESPIFW
 1021 YAPESLTESK FSVASDVWSF GVVLYELFTY IEKSKSPPAE FMRMIGNDKQ GQMIVFHLIE
 1081 LLKNNGRLPR PDGCPDEIYM IMTECWNNNV NQRPSFRDLA LRVDQIRDNM AG

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje humano correspondiente a Jak2 (nucleótidos 1-5285), en donde el "ATG" en **negrita subrayado** denota el comienzo del marco de lectura abierto:

5

1 ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc
 61 tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc cgggctcgct tgggtgttcg cgtcgccact
 121 tgggcttctc ggccggtcgg gccctcggc cgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg
 181 gctgctgcgg cgcagggaga ggcctggctc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga
 241 gccacactg gagggcccc gagggccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgctc
 301 cggggcttcg cagaccttga cccgccgggt agggagccgcc cctgcgggct cgagggcgcg
 361 ctctggctgc ccgatctgtg tagccgggtt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa
 421 ctgtttctct tctgcagaaa aagaggctct tcctcctcct cccgcgacgg caaatgttct
 481 gaaaaagact ctg**catggg**ga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca
 541 cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag
 601 atccagttct tcaggtgtat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga
 661 cctttccatc tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg
 721 gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaaacagaa aggatctggg
 781 atccacccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa
 841 taagatttta ctttcctcgt tggatttgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa
 901 tatctcgagg tgctgaagct cctcttcttg atgactttgt catgtcttac ctctttgctc
 961 agtggcggca tgattttgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg
 1021 aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa
 1081 cccactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttacaaaaa tgtattcgag
 1141 caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtacaga tttcgagat
 1201 ttattcgaca attcagccaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta
 1261 taaatctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaaagta aaagaacctg
 1321 gaagtgggtc ttcaggtgag gagatttttg caaccattat aataactgga aacggtggaa
 1381 ttcagtggtc aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt
 1441 tatattgcga ttttcctaatt attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggtt
 1501 caaatgaaag ccgagttgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac
 1561 ttagctcatt aagggaagct ttgtctttcg tgtcattaat tgatggatat tatagattaa
 1621 ctgcagatgc acatcattac ctctgtaaag aagtagcacc tccagccgtg cttgaaaata
 1681 tacaaagcaa ctgtcatggc ccaatttcga tggattttgc cattagtaaa ctgaagaaag
 1741 caggtaatca gactggactg tatgtacttc gatgcagtcc taaggacttt aataaatatt
 1801 ttttgacttt tgctgtcgag cgagaaaatg tcattgaata taaacactgt ttgattacaa
 1861 aaaatgagaa tgaagagtac aacctcagtg ggacaaagaa gaacttcagc agtcttaaag
 1921 atcttttgaa ttgttaccag atggaaactg ttcgctcaga caatataatt ttccagttta
 1981 ctaaagtctg tcccccaaag ccaaaagata aatcaaacct tctagtcttc agaacgaatg
 2041 gtgtttctga tgtaccaacc tcaccaacat tacagaggcc tactcatatg aaccaaatgg
 2101 tgtttcacaa aatcagaaat gaagatttga tatttaaatga aagccttggc caaggcactt
 2161 ttacaaagat ttttaaaggc gtacgaagag aagtaggaga ctacggtcaa ctgcatgaaa
 2221 cagaagttct tttaaaaggt ctggataaag cacacagaaa ctattcagag tctttctttg
 2281 aagcagcaag tatgatgagc aagctttctc acaagcattt ggttttaaat tatggagtat
 2341 gtgtctgtgg agacgagaat attctgggtc agggatttgt aaaatttgga tcaactagata
 2401 catatctgaa aaagaataaa aattgtataa atatattatg gaaacttgaa gttgctaaac
 2461 agttggcatg ggccatgcat tttctagaag aaaacaccct tattcatggg aatgtatgtg
 2521 caaaaaatat tctgcttata agagaagaag acaggaagac aggaaatcct cctttcatca

```

2581 aacttagtga tcctggcatt agtattacag ttttgccaaa ggacatttct caggagagaa
2641 taccatgggt accacctgaa tgcattgaaa atcctaataa tttaaatttg gcaacagaca
2701 aatggagttt tggtagcact ttgtgggaaa tctgcagtgg aggagataaa cctctaagtg
2761 ctctgggattc tcaaagaaag ctacaatttt atgaagatag gcatcagctt cctgcaccaa
2821 agtgggcaga attagcaaac cttataaata attgtatgga ttatgaacca gatttcaggc
2881 cttctttcag agccatcata cgagatctta acagtttggt tactccagat tatgaactat
2941 taacagaaaa tgacatgtta ccaaatatga ggataggtgc cctgggggtt tctgggtgct
3001 ttgaagaccg ggatcctaca cagtttgaag agagacattt gaaatttcta cagcaacttg
3061 gcaagggtaa ttttgggagt gtggagatgt gccggtatga ccctctacag gacaacactg
3121 gggagggtgt cgctgtaaaa aagcttcagc atagtactga agagcaccta agagactttg
3181 aaagggaaat tgaaatcctg aaatccctac agcatgacaa cattgtaaaag tacaagggag
3241 tgtgtcacag tgctggtcgg cgtaatctaa aattaattat ggaatattta ccatatggaa
3301 gtttacgaga ctatcttcaa aaacataaag aacggataga tcacataaaa cttctgcagt
3361 acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atcttggtag aaaaagggtat atccacaggg
3421 atctggcaac gagaaatata ttggtggaga acgagaacag agttaaaatt ggagattttg
3481 ggtaaccaa agtcttgcca caagacaaag aataactata agtaaaagaa cctgggtgaa
3541 gtcccatatt ctggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagttttct gtggcctcag
3601 atgtttggag ctttggagtg gttctgtatg aacttttcac atacattgag aagagtaaaa
3661 gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaaggacag atgatcgtgt
3721 tccatttgat agaacttttg aagaataatg gaagattacc aagaccagat ggtatgccag
3781 atgagatcta tatgatcatg acagaatgct ggaacaataa tgtaaatcaa cgccccctct
3841 ttagggatct agctcttcga gtggatcaaa taagggataa catggctgga tgaaagaaat
3901 gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgctg
3961 tggactatta ttacatatat cattattata taaatcatga tgctagccag caaagatgtg
4021 aaaatatctg ctcaaaactt tcaaagttta gtaagttttt cttcatgagg ccaccagtaa
4081 aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgaaga agtttcttaa acattgtcag
4141 ttaacatcac tcttgtctgg caaaagaaaa aaaatagact ttttcaactc agctttttga
4201 gacctgaaaa aattatttatg taaattttgc aatgttaaag atgcacagaa ttgtatgta
4261 tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatgtt ttacacacat
4321 gagggctggt gttcattaat actgttttct aatttttcca tagttaatct ataattaatt
4381 acttcactat acaaacaaat taagatgttc agataattga ataagtacct ttgtgtcctt
4441 gttcatttat atcgctggcc agcattataa gcaggtgtat acttttagct tgtagtcca
4501 tgtactgtaa atatttttca cataaaggga acaaagtctt agttttattt gtataggaaa
4561 tttccctgac ctaaataaat acattttgaa atgaaacaag cttacaaaga tataatctat
4621 tttattatgg tttcccttgt atctatttgt ggtgaatgtg ttttttaaag ggaactatct
4681 ccaaattttt ctaagactac tatgaacagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc
4741 caggaatatt gtcatccttt gagctgctga ctgccaataa cattcttcga tctctgggat
4801 ttatgctcat gaactaaatt taagcttaag ccataaaata gattagattg ttttttaaaa
4861 atggatagct cattaagaag tgcagcaggt taagaatttt ttcctaaaga ctgtatatat
4921 gaggggtttc agaattttgc attgcagtca tagaagagat ttatttcctt ttttagagggg
4981 aatgaggtta aataagtaaa aaagtatgct tgttaatttt attcaagaat gccagtagaa
5041 aattcataac gtgtatcttt aagaaaaatg agcatacatc ttaaactctt tcaattaagt
5101 ataaggggtt gttcgttgtt gtcatttgtt atagtgtctac tccactttag acaccatagc
5161 taaaataaaa tatgggtgggt tttgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg
5221 tgttatttat acaaaactta aaatacttgc tgttttgatt aaaaagaaaa tagtttctta
5281 cttta

```

La secuencia de polipéptidos de Stat 1 humana se representa en SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos de Stat 1 humana se muestra en SEQ ID NO: 6. La información de secuencia relacionada con Stat 1 está accesible en bases de datos públicas mediante números de acceso de GenBank ADA59516 (para proteínas) y GU211347.1 (para ácido nucleico).

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje humano correspondiente a Stat1 (residuos 1 - 750):

```

1 MSQWYELQQL DSKFLEQVHQ LYDDSFPMET RQYLAQWLEK QDWEHTANDV SFATIRFHD
61 LSQLEDDQYSR FSLENNFLLQ HNIRKSKRNL QDNFQEDPIQ MSMIYSCLK EERKILENAQ
121 RFNQAQSGNI QSTVMLDKQK ELDSKVRNVK DKVMCIEHEI KSLEDLQDEY DFKCKTLQNR
181 EHETNGVAKS DQKQEQLLLK KMYLMLDNKR KEVVHKIEL LNVTELTQNA LINDELVEWK
241 RRQOSACIGG PPNACLDQLQ NWFTIVAESL QQVRQQLKKL EELEQKYTYE HDPITKNKQV
301 LWDRTFSLFQ QLIQSSFVVE RQPCMPHTPQ RPLVLKTGVQ FTVKLRLLVK LQELNYNLKV
361 KVLFDKDVNE RNTVKGFRKF NILGHTTKVM NMEESTNGSL AAEFRHLQLK EQKNAGTRTN
421 EGPLIVTEEL HSLSFETQLC QPGLVIDLET TSLPVVVISN VSQLP SGWAS ILWYNMLVAE
481 PRNLSFFLTP PCARWAQLSE VLSWQFSSVT KRGLNVDQLN MLGEKLLGPN ASPDGLIPWT
541 RFCKENINDK NFPFWLWIES ILELIKHHLL PLWNDGCIMG FISKERERAL LKDQPGTFL
601 LRFSESSREG AITFTWVERS QNGGEPDFHA VEPYTKKELS AVTFPDIIRN YKVMMAENIP
661 ENPLKYLYPN IDKDHAFGKY YSRPKEAPEP MELDGPKG TG YIKTELISVS EVHPSRLQTT
721 DNLLPMSPEE FDEVSRIVGS VEFDSMMNTV

```

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje humano correspondiente a Stat1 (nucleótidos 1-2353), en donde el "ATG" en negrita subrayado denota el comienzo del marco de lectura abierto:

5

```

1 gtgctgtgcg tagctgtctc tttggttgaa tccccaggcc cttgttgggg cacaaggtgg
61 caggatgtct cagtgtacg aacttcagca gcttgactca aaattcctgg agcaggttca
121 ccagctttat gatgacagt ttcccatgga aatcagacag tacctggcac agtggttaga
181 aaagcaagac tgggagcaca ctgccaatga tgtttcattt gccaccatcc gttttcatga
241 cctcctgtca cagctggatg atcaatatag tcgcttttct ttggagaata acttcttgct
301 acagcataac ataaggaaaa gcaagcgtaa tcttcaggat aattttcagg aagacccaat
361 ccagatgtct atgatcattt acagctgtct gaaggaagaa aggaaaattc tggaaaacgc
421 ccagagattt aatcaggctc agtcggggaa tattcagagc acagtgatgt tagacaaaca
481 gaaagagctt gacagtaaag tcagaaatgt gaaggacaag gttatgtgta tagagcatga
541 aatcaagagc ctggaagatt tacaagatga atatgacttc aaatgcaaaa ccttgcagaa
601 cagagaacac gagaccaatg gtgtggcaaa gagtgatcag aaacaagaac agctgttact
661 caagaagatg tatttaatgc ttgacaataa gagaaaggaa gtagttcaca aaataataga
721 gttgctgaat gtcactgaac ttaccagaa tgccctgatt aatgatgaac tagtggagtg
781 gaagcggaga cagcagagcg cctgtattgg ggggcgccc aatgcttgc tggatcagct
841 gcagaactgg ttactatag ttgcggagag tctgcagcaa gttcggcagc agcttaaaaa
901 gttggaggaa ttggaacaga aatacaccta cgaacatgac cctatcaca aaaacaaaca
961 agtggttatg gaccgcacct tcagtctttt ccagcagctc attcagagct cgtttgtggt
1021 ggaaagacag ccctgcatgc caacgcaccc tcagaggccg ctggtcttga agacaggggt
1081 ccagttcact gtgaagttga gactgttggt gaaattgcaa gagctgaatt ataatttgaa
1141 agtcaaagtc ttatttgata aagatgtgaa tgagagaaat acagtaaaag gatttaggaa
1201 gttcaacatt ttgggcacgc acacaaaagt gatgaacatg gaggagtcca ccaatggcag
1261 tctggcggct gaatttcggc acctgcaatt gaaagaacag aaaaatgctg gcaccagaac
1321 gaatgagggt cctctcatcg ttactgaaga gcttactcc cttagttttg aaaccaatt
1381 gtgccagcct ggtttggtaa ttgacctcga gacgacctct ctgccggtt tggatgctc
1441 caacgtcagc cagctcccga gcggttgggc ctccatcctt tggtaacaac tgctggtggc
1501 ggaacccagg aatctgtcct tcttctgac tccaccatgt gcacgatgg ctcagcttct
1561 agaagtgtcg agttggcagt tttcttctgt caccaaaaga ggtctcaatg tggaccagct
1621 gaacatgttg ggagagaagc ttcttggtcc taacgccagc ccgatggtc tcattccgtg
1681 gacgaggttt tgtaaggaaa atataaatga taaaaatttt ccttcttggc tttggattga
1741 aagcattcta gaactcatta aaaaacacct gctccctctc tggaatgatg ggtgcatcat
1801 gggcttcatc agcaaggagc gagagcgtgc cctgttgaag gaccagcagc cggggacctt
1861 cctgctgcgg ttcagtgaag gctcccgga aggggccatc acattcacat ggttgagcgg
1921 gtcccagaac ggaggcgaac ctgacttcca tgcggttgaa ccctacacga agaaagaact
1981 ttctgctgtt actttccctg acatcattcg caattacaaa gtcattggct ctgagaatat
2041 tctgagaat cccctgaagt atctgtatcc aaatattgac aaagaccatg cctttggaaa
2101 gtattactcc aggccaaaag aagcaccaga gccaatggaa cttgatggcc cttaaaggaa
2161 tggatatatc aagactgagt tgatttctgt gtctgaagtt cacccttcta gacttcagac
2221 cacagacaac ctgctcccca tgtctcctga ggagtttgac gaggtgtctc ggatagtggt
2281 ctctgtagaa ttcgacagta tgatgaacac agtatagagc atgaattttt ttcattctct
2341 ctggcgacag ttt

```

La secuencia de polipéptidos de Stat 2 humana se representa en SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos de Stat 2 humana se muestra en SEQ ID NO: 8. La información de secuencia relacionada con Stat 2 está accesible en bases

de datos públicas mediante números de acceso de GenBank AAA98760 (para proteínas) y U18671.1 (para ácido nucleico).

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje humano correspondiente a Stat2 (residuos 1 - 851):

5

```

1  MAQWEMLQNL DSPFQDQLHQ LYSHSLLPVD IRQYLAVWIE DQNWQEAALG SDDSKATMLF
61  FHFLDQLNVE CGRCSQDPES LLLQHNLRK F CRDIQPFSD PTQLAEMIFN LLEEKRIIL
121 QAQRAQLEQG EPVLETPVES QQHEIESRIL DLRAMMEKLV KSISQLKDQQ DVFCFRYKIQ
181 AKGKTPSLDP HQTKEQKILQ ETLNELDKRR KEVLDASKAL LGRLTTLIEL LLPKLEEWKA
241 QQQKACIRAP IDHGLEQLET WFTAGAKLLF HLRQLLKELK GLSCLVSYQD DPLTKGVDLR
301 NAQVTELLQR LLHRAFVET QPCMPQTPHR PLILKTGSKF TVRTRLIVRL QEGNESLTVE
361 VSIDRNPPQL QGFRKFNILT SNQKTLTPEK GQSQGLIWF GYLTLVEQRS GSGKGSNKG
421 PLGVTEELHI ISFTVKYTYQ GLKQELKTD LPPVVISNMN QLSIAWASVL WFNLLSPNLQ
481 NQQFFSNPPK APWSLLGPAL SWQFSSYVGR GLNSDQLSML RNKLFQGNCR TEDPLLSWAD
541 FTKRESPPGK LPFWTWLDKI LELVHDHLKD LWNDGRIMGF VSRSQERRLL KKTMSGTFL
601 RFSESSEGGI TCSWVEHQDD DKVLIYSVQP YTKEVLQSLP LTEIIRHYQL LTEENIPENP
661 LRFLYPRIPR DEAFGCYYQE KVNQERRKY LKHRLIVVSN RQVDELQQPL ELKPEPELES
721 LELELGLVPE PELSLDLEPL LKAGLDLGPE LESVLESTLE PVIEPTLCMV SQTVPEDQ
781 PVSQPVPEPD LPCDLRHLNT EPMEIFRNCV KIEEIMPNGD PLLAGQNTVD EVYVSRPSHF
841 YTDGPLMPSD F

```

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje humano correspondiente a Stat2 (nucleótidos 1-18648), en donde el "ATG" en **negrita subrayado** denota el comienzo del marco de lectura abierto:

10

```

1  tcaagatcag cctgggcaac atggcgaaac cccgtctcta caataaatat aaaaaaatta
61  tcctggcgga gttatgcacg ttgtagtccc aactacctgg gaggctgagg cgggagaate
121 acctgagcct gggaggcgga ggtgcagcgc agccgagatc ggccgctgca ttccagcctg
181 ggtgacagag cgagaccatg tctcaaaaaa taaaaattaa aaaaaattg ttttcattac
241 ctcagccctc ctcttcctat cccaaggcgt cgaaattccg gtccaccccc tcccatgga
301 gcccttggcg tctccaggct cctcaagcta gtttcggttc cgggctcacg cgcgggttct
361 cgaaaatcag ctgtttcagt cttgggctag tccactaatt ggactcctcc cctcgtagaa
421 agtgccctact tgaacttctc caccaatcgc tgaagctgca ggtgtggttt cggctcagct
481 tgtcccgccc tggcgagggg gcggagtgtc ggcgcgccca gtgagctcgc agtctgggaa
541 gggcttgact gaatggcagc cagtgtcggg gtggcggtcg ggaatggggg ccgctccgga
601 cttccgctgc caactacaag gggcggggtc cgaggggggt tagccgaagt ttagggcggg
661 gcgcgagggt ctagtaccgc agctcatact agggacggga agtcgcgacc agagccattg
721 gagggcgcgg ggactgcaac cctaatacag tacgggccct gagaggggtg gctggggtag
781 ggggtggggg gagagtgaga gttcctccga gggaaggcg actggcccag gggttacccc
841 ctggagaggg tagcttcctt cccagattg aaataggagc tgtcgcctgc tcggctctcg
901 atcttcttct gtccagccta tctccctaac cctaattgcc ctctcccaaa actgccttgc
961 agcttccgag acccggaatc tggcattgtt atgttggttc ggtatctgac gtttttccct
1021 ctgctctgca ttatttttta tcttcaccaa aaaacgatgt tcaaagatag ataaatctaa
1081 aaacaaagat agataaatct attacccttg ttcgtaaaaa agtataagct actgaaagat
1141 gaaacgattg cctaagggtc cacacaaaat tcagttcatt tcagaaaagc ttcttgagtg
1201 caaaatatgt gcctaagaat gagagataat gagaaaaaat tgtttcagcc ccttaacctc

```

1261 agtgttttga atccatttgg ggagaccagg ttttttgttt ttgttttcat atttgaatct
 1321 ttgctgactt gctcctttta tatcagacac ttaaactctc agatgggact catcatattt
 1381 tttttgagat ggaatcttca ctatgttgc caagcttggc ctgcaactcc tggctcaagc
 1441 catcctctcg tcttgttggg cctctcgtct tgtgggcctg cacaaagtgc tgggattaca
 1501 ggcattgagcc attcatgccc tgggcgcacc ttggattgcg atgtgtgtgt gttgtgaage
 1561 tttttttttt ggtatcataa aagcaataca gatacatagt tttaaaaatc aagcagctac
 1621 taaaagagtt aaaatgaaaa tagccctcc caatccctcc cttgttctcg ctggaggtag
 1681 aaaggcagct gatgttatcc atgttagtag aagactctcc caccccaagc atttctcttt
 1741 attttgtaat aaaatcatgt gaccttttta gaccacaaat atgcatgaat tctgttctgt
 1801 taggtcagg ctgcaacaag ataagtttca gtttctctaa tagacaccag ctggcagtgga
 1861 gcagggaaca atggggagaa agatgattgg gacagcctgc ttggtgacag gcaaaaagcg
 1921 gtttgttgtt cttttagaga cagagtcttg ctttgtcacc caggctggag tgtagtgtatg
 1981 tgatctctgc ttactgcaac cctgcctctg ggtacaagcc atttctctgc ctgagcctct
 2041 tgagttagctg ggattacagg caacaatttt aagtgaagtg aagtttcagg atctcgagca
 2101 aagttgtata acctataatc atattcaaga ttacacagtc ataaacgtgt catattcttg
 2161 ggattgagcg acccattgca cagcatctag atgtgcttct agaattggagc tctcctctcc
 2221 tatatggagg gcagtttata tgggtgactt acctgaccac caaaaagatt tggctctaaa
 2281 aaagcttcag gtggccgggc atggtggttc acccctgtaa tccagcactt tgggaggcag
 2341 glgggcagat cactlgaggl cagaagttca gacagctgga calalggiga aacctcalcl
 2401 ctactaaaaa tacaaaaatt agactgggca tggtagtggg cgcctgtaat cccagctagt
 2461 cgggagcctg aggcaggaga atcccttcaa clcggacggc agaglllgca glgaggccga
 2521 gctcgtgtca ctgcagttca gcttgggtga cagagcaaga ctccatctca aaaaaagtaa
 2581 aaaaaaaaaa aaqaaaaaaaa aaagcttcag agccagcaag gatcatgctg taataaatatc
 2641 ttaacatcaa cactgatctt taaatgcttt agcacaatca aatataaata acaaacacac
 2701 acataaatgc aaaataaatg aattagggag atagatgaaa taagattgtg gaaatagtaa
 2761 tgtttgttaa agctggatgg tgatccttgt actattcact ctactctagt gtgtatttga
 2821 aaattaccat taggctgggt atggtggctc atgctgttta atcccgcat tttggaaggc
 2881 tgaggcaggc ggattacttg agctcaggag ttttagagtct gcttgggcaa catggcaaaa
 2941 tcccatctct acaaaaaatt agctggcatg atggcacact cctgtagtcc cagctccttg
 3001 aggggctgag gcagagaatg gcttgaacct gagaggctaa agctgcagtg agccaagatc
 3061 atgccactgc actccagcct gggtgaccaa gtgagaccct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa
 3121 aaaaagaaaa gaaaattccc attaaagcac aaaggccac ttattgaagc tattaataaa
 3181 caggttgggg ccgctgggc atcgcgcac gcttgaatc ccagcacttt ggaaggccga
 3241 ggtaggcgag tcacaggttc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg tgaaacccca
 3301 tctctactaa aaatacaaaa aaaaaaatca gccgggcatg gtggcgggag cctatagtcc
 3361 cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcattgagcc cgggaggcgg agcttgcagt
 3421 gagccaaaat cacaccactg cactccagcc tgggcaacag atcgagactc catctgaaga
 3481 aaaaaaaaaa acaggttggg accacagtgg ctcatgcctg taatcctagt actttgggag
 3541 tccgaagttag gtggtatcac tgaggtcagg actttgagac cagcctggcc aacatggcaa
 3601 aaccccatct ctactaaaaa atatacaaaa attagctggg cgtggtgggt ggtgctgtga
 3661 atcccagcta ctccaggagc tgaggcagaa gaatcacaac aaccaggggg atggtggttg
 3721 caatgagcca agatcatctc cacttcactc cggcccaggc aaaagagtga gagtcatctt
 3781 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaata cagattaggg atttctaata tgaaaaatct
 3841 ggtccaaaaa ggtccagtc gagcatctcc tttgagtgtc atgtgggtgc tcaaaaagtt
 3901 agatttttgg accattttca gatttcagag ttttggatta gggatgctcg aaatgtaagt
 3961 aatcgagata ttccaaaaat ctggacaaat ctgaaatcca aaatgcttg aatagcagat
 4021 actcaactgg tagcactccc tggagaata tgcaccaaac tgatagcagt ggttaccttc
 4081 tggtgaggag gggaaagaac caagattagc agtaggatca acatatattt taatgttttc
 4141 tgtattttta ttacttgtat aattttaaaca ttttaaatta gtaataatga acaatcatga
 4201 aactatggat gatttagtcc agcaaaatat ccaattggga accctcatcc ttctgcagag
 4261 cccaaatggc gcagtgggaa atgctgcaga atcttgacag cccctttcag gatcagctgc
 4321 accagcttta ctgcacagc ctctgcctg tggacattcg acagtacttg gctgtctgga
 4381 ttgaagacca gaactgggtg ggccttcagg aagttggggg aatgaaaaag gtggccttcc
 4441 acttctgggc cccggggtat ctggaatcat taatggcagg aagggttggt aaagcctcag
 4501 gactacagta aactgcaga gacactaata cttcttatcc ctggtcccag gcaggagct
 4561 gcaactggga gtgatgattc caaggctacc atgctattct tccacttctt ggaatcagctg
 4621 aactatgagt gtcgcccgtt cagccaggac ccagagtcct tgttgcctga gcacaatttg
 4681 cggaaattct cccgggacat tcaggtaactt ggaacggttg ggagtgtatg ggtagcactg
 4741 ggagcagagc atagaggagt aaggtttgga gaatagaata gtacctggag gtggcaaggg
 4801 agacgggaac aaatgtgggg aaaggaggac agagtctgga cttggggaat cactagcaga
 4861 gagaagggtt gcatatacgt gacactgttg ggaggatgct atggtgaaaa gacaaagggc

ES 2 746 554 T3

4921	taagaacccc	gaaggaggag	gaaatactgt	ggacatttgt	ggggagggtc	tagggcaata
4981	ggtcattgag	agtggttgaa	ttggatcaat	cctttctgtt	tacctttctg	ttagcccttt
5041	tcccaggatc	ctaccaggtt	ggctgagatg	atctttaacc	tccttctgga	agaaaaaga
5101	attttgatcc	aggctcagag	ggcccaattg	gtgaggacaa	ttcagtggtg	atggttgaaa
5161	ctcctgaagt	agagagggaac	catggaaagg	actcaggggg	ttgtctcaga	acaggatccc
5221	cccgacatcc	tgtggtataa	tttcagggct	gaacttaagg	catgaaaggc	cagagttaaa
5281	acgtgctcag	agcctctttt	ttcagggaaca	aggagagcca	gttctcgaag	cacctgtgga
5341	gagccagcaa	catgagattg	aatcccggtg	cctggattta	agggctatga	tggaggttag
5401	tagatgtggg	aggagcttag	gttgacagtg	ttcaggctaa	cacctccctg	agaagcagcc
5461	tcctcggggg	ccctctccct	ctgcagaagg	tggtaaaatc	catcagccaa	ctgaaagacc
5521	agcaggatgt	cttctgcttc	cgatataaga	tccaggccaa	aggtaggaag	cacattgag:
5581	ggctggagaa	agataagtgc	ctgctgagaa	gccggagctg	gaagtgaaca	ggagaaagc:
5641	ccgatgagca	gtagtcactg	tcagacacac	cccactgact	acagtccctg	tgccgtgcaa
5701	agctggaatc	gtgcttttgt	gaggctgagc	tggagggtgac	agctgagaga	cagtaaattg
5761	ttgaggaaat	gcatggaaaa	ctaacagtgt	tttatttgag	ggggtgtctg	gtccaagatg
5821	accacttcag	aatttgccct	gagggtccca	cagggtgctg	tgctttgctt	ggtttccctt
5881	tcttccctcg	ccacaaaatt	cctccttctt	gactctgact	gagaccccag	tcaggaaggga
5941	gaggaaagaa	cccctggact	gactcctggt	cccaccatcc	aggggaagaca	ccctctctgg
6001	acccccalca	gacccaaagag	cagaagallc	lycaggaad	lclcaalgaa	clggacaaaa
6061	ggagaaaggt	gggagggcgc	agaacagaa	atgtgggcaa	caaggacctg	aaaaaatgag
6121	ggatgllggg	aacccclggl	alclagcgcl	ggclclclcl	llclclclcl	cccagllggg
6181	tgggtggagg	tgaaagggag	agatgctcaa	cactcacatt	atctctttcc	caggaggtgc
6241	tqqatgcctc	caaagcactg	ctaggccgat	taactacctt	aatcgagcta	ctgctgccaa
6301	agttggagga	gtggaaggcc	cagcagcaaa	aagcctgcat	cagagctccc	attgaccacg
6361	ggttggaaaca	gctggagaca	tggtgagagg	taccacccca	accctcgctc	tcgccatgcg
6421	ctgtgatttg	taagttgcag	tgccctgcat	atagcaagag	atactgttct	ctatttgtct
6481	ctgctcccca	gaatagagcc	ctgctccctg	cctgactgca	gctctattct	gcctcctcag
6541	cctcaccacg	cagggaagcc	cagaagctcc	agtcctcttc	agggaaaggga	atgaattaac
6601	ccacaattctg	gttttgcttc	ttttttttaa	tcacccagaa	atatatatat	atgatttttt
6661	tttttactcg	aacgaataca	atgacaagaa	aggaagggaa	ggaagggaag	aagagaaaat
6721	tacctattac	ctagcttatt	aaacaaaaat	ggaatcatat	tgtccatact	attttgaatt
6781	ccatgggggtt	ttttttaagc	ttaacagtat	tttatatata	tatatatata	tatatatata
6841	tatatatata	tatatatata	tatatatttt	tttttttttt	tttttttttt	ttttgagacg
6901	gagtctctct	ctgttccctg	gctggcggag	cggagtcggc	acgatctcag	ctcactgcaa
6961	cttccaactc	ccacgggtca	agccaattct	cctgtctcag	cctcccgagc	ctgggattac
7021	caggcacaca	ccagcctggc	tagt.tttttt	gatt.tttttg	tagagacgat	g.tttctccat
7081	gttggccagg	ctggtctcaa	actcctgact	tcagggtgat	cacccaactt	gggctcccaa
7141	agtgtctggg	ttacagcgct	gacgaccatg	cccgcccaac	agtatattat	atttatccat
7201	gttattttctt	atgtccacac	aacagtcctc	taatatgttg	taacataatt	taattaatga
7261	actcctatttt	tcagctatttt	aggttatttt	caatttcttg	ttaccttttg	ccaggaaacg
7321	tatatatttat	ggtaattata	ttgtgttgta	gaaaaatcac	tagtctagtc	caacttgctt
7381	gaaaaatagc	tactttttta	ctattttctc	atttaaaaaat	ttattataat	ttagtctttt
7441	agaaatatac	caggccaggc	atggcgtctc	atgctgttta	tcctagtact	ttggaaggct
7501	gaggacggag	gatactttca	gtcttggggt	ttgagaccag	cccgggaaac	ataacaagac
7561	cccatctcta	caaaaaaaaaa	aaattgtttt	taattaggca	tgtccgacac	agtggctcac
7621	acatgtggcc	agcactgtgg	gaaggccaag	gtgggtggat	cacttgaggg	tcaggagttc
7681	aagaccagcc	tggccaatgt	ggtgaaaccc	catctctact	aaaaatacaa	aaatttgcca
7741	ggtgtggtgg	cgcgtgcctg	tattcccgag	tactcaggag	gctaaggcag	gaaatcactt
7801	gaactcggag	gcagaggttg	cagtgagctg	tgacaattgc	actgtactcc	agcctgggtg
7861	acacagcgag	ctcgtctcca	aaaaaaaaaa	aaaaagatta	ggcatgggtg	cacacgcctg
7921	tagaccctag	ctactcagga	ggctgagggt	ggaggattgc	ttgagcccag	gtgttgaggg
7981	ctgcagtgag	ccatgattat	accactgtag	tccagcctgg	acaacagaac	gagaccctgt
8041	ctctaaaagt	atatatgtac	acataccata	atacccagct	actgaggagg	ctgaggcgag
8101	aagagtgcct	gagtccagga	gtttgatgtc	agcctgagca	atatagcaag	accctcacct
8161	cttaaaaaaa	tttaagtag	attaaaaaaa	taccacaatt	gctcaggtag	attaaaaaaa
8221	taccacaatt	gctcaggtag	attattgaaa	aacaggcata	tagtacttat	ggtacaggac
8281	cagcatgcct	gcctgcctgc	attgattgat	tgattgattg	attgattgag	acagggtctc
8341	tctctgtctc	ccaggctgga	gtgcctggcc	ttaaagtgat</		

8581 gttcccaact gaatctatatt ctoatgtgta gtgtatgggt gttttcctgt caccacattg
 8641 ctgattatta ttattttttaa ttatagagac agtaaagtao agtagttaaa aatgtgagt
 8701 ggggctgggt gcagtggctc acacctgtaa tcccagcaat ttgggaggcc aagggtggcg
 8761 gatcaoctga ggctcaggagt tcaagaccag cttggccaac atggcaaaac cccgtctcga
 8821 ctaaaaatat atatatataa gtttagccggg cgtgggtggca acattacctg taatcccage
 8881 tactcgggag gccaacaggc aggagaatct cttgaatoca ggagggtggag gttgcagtga
 8941 gccagatcac accattgcac tccagcctgg atgacaagag agtgagactg tctaaaaaaa
 9001 aaaaacaaaag tgtgagttgt acaatgagac tgccctgggat cacatacaag cttcatccct
 9061 taactagtgt attgacccta aagcaagtao ctaaccttct tgtgcccctc agttttatca
 9121 tctgtaatgt ggggaaaata atagtacctg cctcagaggg ttgttttgag gattaaatgc
 9181 attaatatgt ggaaagggct taatataagt tgtacatagc atatgaaaaa tgttatgtta
 9241 aatctattag cagttttata tgtgaaaata gctttgattt tcatttcttg gattatgaat
 9301 catggtgaat aatcctttat atgcttctct gattcctttt ttttcttccc cccagtcagt
 9361 tctgactct tctcatatt atagagagat cttggaacct ggatggggga atccaggaaa
 9421 ctoatggatt ccttcttctt gaattttatc acccagggtc acagctggag caaagctgt
 9481 gtttccacct aggcagctgc tgaaggagct gaagggaact agttgcctgg ttagctatca
 9541 ggatgacct ctgaccaaag ggggtggacct acgcaacgcc caggtcacag agttgctaca
 9601 gcgctctgct caccaggtcta gaggccaggc aggaacctg ggggaaagaa ggaacaaggg
 9661 aagccattct tacacatact gagctatata ttctctccac acctctctct cctcgagcc
 9721 ttglggtaga aacccagccc lgcaltcccc aaactcccc lcgacccctc atcccaaga
 9781 ctggcagcaa gttccacgtc cgaacaaggt tggcattcca gaactcatc ccacttctc
 9841 tttccaaacc tgccactgtg tattttctgg ctttacagct actgcccact cttggcttt
 9901 tcagtccttc ctgaatctcc ctacctcgtt gataccccat cgtcctcttt tccaaacacc
 9961 tagcctatac aaaagccgac tccgaccaca ttccctata ccccttgact tcccaggct
 10021 gctgggtgaga ctcagggaag ccaatgagtc actgactgtg gaagtctcca ttgacaggta
 10081 aattggagca ggtgaagggt ggcagggaca cgggctgctg ggggtggagga gatactcact
 10141 cttcacaaca gggccctagg gctatatcct tctccttccc aatccatctc cacagaaat
 10201 ataattcatt tctttgttg aacacttact ttgtgacatg cagcatgtca gctactat
 10261 taattgtcac accaacccca tgaataaact attaccagtg cactgtacaa acaaagatac
 10321 aggccttagag agactgatta catctcttct caaggccaca tagctagtga gctcaagtgc
 10381 ggtttgaacc gaggtctgtc tgatcccaaa gacgaaactc ctaacttcca tactcttttg
 10441 cccaatgatt ttttttaaatt ttatttcttt tcagggaatc tctcaatta caagggtagg
 10501 tgcttgacaa ggacactgca aacatctgta cagtgtatga cctgcagaa cgggggatt
 10561 gggaaaatgga caaagggaga tggcgagatc tgaaatggaa gtggaacttc agttttttt
 10621 tttctgctg agtttttaca ataattccat tcttgtctc catgtatct cctcctggaa
 10681 cagcttccgg aagttcaaca ttctgacttc aaaccagaaa actttgaccc ccgagaaggg
 10741 gcagagtccag ggtttgattt gggacttttg ttacctggta agaatagttt gtgacctatg
 10801 cttttattac tatttttatt ttttcgagac ggagttctac tctgtccccc aggetggagt
 10861 gcagtgggtc catcttggct caccaggaacc tccgcccctc cgggttcaag caattctct
 10921 gtctcagcct cctgagtaag tagagctata ggcagcacac caccatgccc ggctaattt
 10981 tgtattttta gtagagatag gttttccaca tattggctgg gctgggtctg aactcctgac
 11041 ctcaggatgc ccgacccgcc tcagcctccc aaagtgtctg gataccagcc atgagccacc
 11101 atagctggcc tgcctttagt ccaaagggaac aggggttggg ggaagtccc agggcttgag
 11161 aggtcttgaa gccaaacagg ggttccaggg agactagggt gccactctg gcattttctc
 11221 tcttccctt caattccacag actctgggtg agcaacgttc aggtgggtca ggaaagggca
 11281 gcaataagggt gagatctgga cagagggaact gaggcagggg gagcttgcca aagagccttc
 11341 tgatgactat gtctttgctt gtcocagagg ggcactagg tgtgacagag gaactgcaca
 11401 tcatcagctt caccgtcaaa tatacctacc agggctctgaa gcaggagctg aaagtgagtg
 11461 aaaatggagg gcaaggagag agaaagcagc tttggaagaa ggcataagaa ggggataaac
 11521 agaagcctct tggggagggt tagcactcct tctcttaac aaataacctg agctagaaac
 11581 atcacatccc tctctgtgac tctgtcttcc tcccacaca cggacacct cctgtgggtg
 11641 attatttcca acatgaacca gctctcaatt gctgggctt cagttctctg gttcaatttg
 11701 ctcagoccaa accctcagggt aggggagtg ggcagacagg tcccggcgag agagcagggg
 11761 tgtggaagct tgggtgtgata ggttgcttct gagccagcct acaetgctcc caccctgca
 11821 gaaccagcag ttcttctcca acccccccaa ggcocctgg agcttgtctg gccctgctc
 11881 cagttggcag ttctctctct atgttggccg aggcctcaac tcagaccagc tgagcatgct
 11941 gagaacaag ctgttcggta cagatttctt ttctctcag cctttccca gccttagtct
 12001 tttctgccc tctgtctat ctatccagc acccctggct tccctacat atctgtgct
 12061 atctgtccca cagggcagaa ctgtaggact gaggatccat tattgtctg ggtgacttc
 12121 actaaggtaa ctcctgaat cctgtggagc tgctggatct agcccacat tccaaatac
 12181 ggccctccca cgtgcccctc ttccctacac cagaggcaac tctcagctt ttgtacctt

12241 tccatttcctc cagcgagaga gccctcctgg caagttacca ttctggacat ggcctggacaa
 12301 aattctggag ttggtacatg accacotgaa ggatctctgg aatgatgggt aaggccttgg
 12361 tcacccctcc ctcatgggct tgtgcttcog ggcttgagag tggagtctct gcacccctac
 12421 gtggcaagca gggagagaga gccaaagcag gtgcaggcca cgtctcctca catttggttaa
 12481 gaataataag gccgggtgtg gtggctcaca cctgtaatcc cagcactttg ggagggcagag
 12541 gggggcggtat catgagggtca ggagatcgag accatcctgg ctaacacggg gaaaccccg
 12601 ctctactcta aaaatacaaa aaatttagccg ggctgtggagg cagacacccct gtagtccacag
 12661 ctactcagga ggctgaggca ggaanaatggc gtgaacctgg gagatggagc ttgcagtggag
 12721 ccgagattgc gtcaactgcc tccagccttg ggggtgaogta gcaagactcc gtctcaaaaa
 12781 aaaaaaaaaa aaacaacca taatagccat aaacagtgtt tttgtgaagc actcctacat
 12841 tccagagctt gatgggtgct ctctcattat tctctcatct catccttaca accatgctga
 12901 gtgggtgggtt ttgccagctt catttcatgt gaggaaactg agtttcagag aagttaaaga
 12961 acttacccaa gggacacagt tgatattcaa atccaggcct atgtgactcc aagcccatgc
 13021 tctttccacc acaactgcct ccaacttgtg tagcatttgg cttttaaaag tgcattcat
 13081 gaccaggcac gatggctcac gcccttgtaat cccagcattt tgggaggccg aggtgggtgg
 13141 atcacctgag gtcaggagtt tgagaccagc ctggccaaca tggcgaaacc ccactctat
 13201 taaaaataca aaaattagcc ggggtgtggg gtggggcctt gtaatcccag ctactcagga
 13261 ggctgaggag gagaatcgct tgaatttagg agagaagggt acagtgagcc aagatcgtgc
 13321 cattgcactc cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct caaaacaaaa ccaaaaaaaa
 13381 gtgclatlll lyggccaggcg lygllgclca tgcctglaal cctagcatll llygggagggc
 13441 tgaggagtac agatcacttg agcccaggag ttcaaaacta ccttgggcca cgtgggtgaa
 13501 ccccaaaccc cgtctctacg aaaaatacaa aagttagcca ggatgggtgg tgtgcacctg
 13561 tggctccagc tactctggag cctgagagggt ggggaagatt gcttgagccc gggaggctga
 13621 ggtggcagtg agctgtgatc atgccaactat tctccagcct ggggtgacaga atacacccctg
 13681 tctccctgct tcccagaaaa aaaaaaaagt gctgttcate tgtgtgatct caactgaatc
 13741 tctgacttca aacctcgga aggtggctat tctcagcaaa gtgaagtgc ttgtaaaaga
 13801 taataaaaag ctaagtggca gggcttggte caaagcctgg attccaaacc tgggctgttt
 13861 ctccatacaa ggggagcagg gaggcagggg cctggggggg cagggtgttg ggcgtgttca
 13921 cacgtgacac actgtgctcc agacgcacta tgggctttgt gactcggagc caggagcgc
 13981 ggctgctgaa gaagaccatg tctggcacct ttctactgcg ctccagtga tctgcagaag
 14041 ggggcattac ctgctcctgg gtggagcacc aggatgatgg tagctgctct gccctgccat
 14101 tcccacagcc tctcctttct gccctggctct cctctggccc ctctgcctgc cttgcttgc
 14161 tggctctgaa ctgaatgctc agtgggttgg gactgggcag ccagagagtc agagagctcc
 14221 aaggcccgcc ctcttccctc aagcccgctt gttcctgcct tcaactctca gacaagggtgc
 14281 tcatctactc tgtgcaacog tacacgaagg aggtgctgca gtcactcccg ctgactgaaa
 14341 tcatccgcca ttaccagtgt ctcactgagg agaataatcc tgaaaaccca ctgcgcttcc
 14401 tctatccccc aatcccccgg gatgaagctt ttgggtgcta ctaccaggag aaagggtggga
 14461 atcgttgaca tacttcatgt ctgatttga gagatctacc agacatccat agatcccat
 14521 ccttccctta aagcatggga aaactgatat ctgagggaat taagggtatc gtccatggga
 14581 tactgctgggt tactatgggg atgagactgc caggaccatc tgcactaggg gaaaacctca
 14641 ggcctatatgt ctggcccact gatctctctc gcttcttcta tatgttctc acagttaatc
 14701 tccaggaatg gaggaaatac ctgaaacata ggctcattgt ggtctctaat agagtgaat
 14761 atgaacgtt cattcatcct cctaatcct tattggctct gcttcagtga atcgtcaaaa
 14821 gggggcatta ccttctcctg ggtggagcac caggatgatg gtcagctgct ctgccctgcc
 14881 attcccacag cctctccttt ctgccttctc ctaagctgcc cctattccag tctcccagc
 14941 cttcccctcc tctagccccc actctagttt tttctgggtc tagtctctcc tatctcata
 15001 tttctctgct ccactcctag gttgtctcca cagggggttc tggataataa tgatcataat
 15061 cactgggtgt aagggggtacc tacttgatgc aagcatggag cttttttttt ttccagacag
 15121 ggttttgttc tgtgccccag cctggagtgc agtgggtgtga tctggctca ctgcagcctc
 15181 gacctcctga gctcaagcaa tacaggcatg catcacaaaa ctcagctaat ttttttgtta
 15241 ttttttgtag agatgggggtc ttaccatgtt gacgcacag gctgttctga actcctggac
 15301 tcaagcaatc caccacacct ggcctcccaa aagtcaggga ttacaggcgt ggcaccacac
 15361 ccgcacataa tatatttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagac aggggtctctg
 15421 ttatccagggc tggagttgca gtggataata tgaactagag ccttgacctc ggggttgaag
 15481 caatgcctct gctcagcca ccaagtgtgt agactacagg cacacgcca tetacactca
 15541 atcacactca gctaattttt taaatttttt gtagggatgg ggtatcactg tgtttgccc
 15601 ggtgtgtctt gaactcctgg cctcaagcag tctcctgctt tggcctccca aattgcgggg
 15661 attgtaggaa tgagccatgg cacttggctg ggggatagaa tttttttttt ttttttttt
 15721 tttttttttt ttgagacagt ctcactctca ttgcccgggc tggagtgcag tgggtgcaat
 15781 tcagctcact gcaacctctg cctcccaggg tcaagcaatt cctctgcctc agcctataga
 15841 gtagctggga ttacaggcga cgcgccacca tgcctgggtta atttttgttt tttttttgag

```

15901 acagagtctc gccctgttgc ccaggetgga gtgcagtggc acgatctcag ctcaactgcaa
15961 cctctgcttc ccaggetcaa gcaattctcc tgcctcagcc tectgagtac tgggaactaca
16021 agcgcgcaca accaccacac ctggtaattt ttgtatTTTT agtagagaca gggTTTTacc
16081 atattggcca ggctgggtctc aaactcctga cctcatgac cgacccacct tggcctccca
16141 aagtgcaggg attacaggcg tgagcctctg caccggcct aactTTTTgt tTTTTagtag
16201 aaacaggggt tcaccatgtt ggccaggctg gtcatgagct cctggcctca agtgatctgc
16261 ccgcctcagc ctcccaaagt gcttggatta caggtgtgag ccacctggcc tgagagttta
16321 ttatgcgcca ggcactaggc aaatggTTTT catttatttt ctcatTTTTat tgaatctaca
16381 aaatagtcct gtgaagtaaa cactgttaact gttttcagct aaggaaactgg attttagagta
16441 gtcaagtttt gtacctaaagg tacgtggcta atgatacagg tctgttagat tccgtagccc
16501 tgattttaac caccctactg cctctcaaga attactagggt attgttctca tttatagatg
16561 ataaatctga ggctcagaaa agttaggcca cttgcctaag gtcccccagc caggattcaa
16621 actccaggag gctgattcc aaaccatgc tctttagccc tccgcccac tgccttctta
16681 gactagcttc tgcttattct accattcctg atttcatttg aaccactgag cctgcccct
16741 ttgtctgtct ttgggtatcc aggcaggtgg atgaactgca acaaccgctg gagcttaagc
16801 cagagccaga gctggagtca ttagagctgg aactagggtt ggtgccagag ccagagctca
16861 gcctggactt agagccactg ctgaaggcag ggctggatct gggggccagag ctagagctctg
16921 tgctggagtc cactctggag cctgtgatag agcccacact atgcatggta tcacaaacag
16981 tgccagagcc agaccaagga cctgtatcac agccagtgcc agagccagat ttgccctgtg
17041 atctgagaca tttgaacact gagccaatgg aaagtaagtg atgagatgga gtggcacaca
17101 tcccttttc tacctcttct cctctccca ttacagaaa agctgaactc caagctcctc
17161 attggagaga ggtccatctg tgattccttt ttttaggaat tacacatgcc tccccccacc
17221 tccctgctct ttcattccac aagtcccccac tcaggctctt cccaggcctt tccctgccatc
17281 ctcctccctc tgggtgctg ggttgggaac tctaactaa gatcggggcc tcactttctc
17341 ctctggatta cctagtcttc agaaactgtg taaagattga agaatcatg ccgaatgggtg
17401 acccactgtt ggctggccag aacaccgtgg atgaggttta cgtctccgc cccagccact
17461 tctacactga tggacccttg atgccttctg acttctagga accacatttc ctctgttctt
17521 tctatatctc tttgcccttc ctactcctca tagcatgata ttgttctcca aggatgggaa
17581 tcaggcatgt gtcccttcca agctgtgtta actgttcaaa ctcaggcctg tgtgactcca
17641 ttgggtgag aggtgaaagc ataacatggg tacagagggg acaacaatga atcagaacag
17701 atgctgagcc ataggtctaa ataggatcct ggaggctgcc tgcgtgtctg ggaggatatg
17761 gggctcctggg ggcaggccag ggcagttgac aggtacttgg agggctcagg gcagtggctt
17821 ctttccagta tgggaaggatt tcaacatttt aatagttggg taggctaaac tgggtgcatac
17881 tggcattggc cttggtgggg agcacagaca caggatagga ctccatttct tcttccatt
17941 ccttcatgtc taggataact tgctttcttc tttcctttac tectggctca agccctgaat
18001 ttcttctttt cctgcagggg ttgagagctt tctgccttag cctaccatgt gaaactctac
18061 cctgaagaaa gggatggata ggaagtagac ctctttttct taccagtctc ctcccctact
18121 ctgcccccta agctggtgtt acctgttct ccccataaa atgatectgc caatctaatg
18181 tgagtgtgaa gtttgcaac tagtttatgc taactagtct caactttctc aatgottagg
18241 agacagatca ctctggagg ctggggatgg taggattgct ggggattttt ttttttttaa
18301 agagggtctc actctgttgc ccaggctaga gtgcaatggt gcaatcacag ctcaactgcag
18361 cctcaacctc ctgggttcaa gcaactctcc taactcagcc tectgggtga ctagcaccat
18421 ggcctgccta ccatgcccta tttttttttt ttaaagacag ggtcttgcta tattgccag
18481 gctggtcttg aactgggctc aagtgatcct cagccttgc ctcccaaagt gctgggatta
18541 taggcatgag ccaactgtgt tggccaggat tttttttttt ttttttttga gatggagttt
18601 ctctcttgtt gtccaggctg gagtgcattg gtgtgatccg gggaatte

```

Variantes de proteínas: Las variantes de proteínas pueden incluir modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos se dividen en una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o eliminación. Las inserciones pueden incluir fusiones de terminal amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Las inserciones normalmente serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones terminales amino o carboxilo, por ejemplo, del orden de uno a cuatro residuos. Las eliminaciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de la proteína. Estas variantes normalmente se preparan mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo así el ADN que codifica la variante y, a continuación, expresando el ADN en cultivo celular recombinante.

Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis por PCR. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser residuos únicos, pero pueden ocurrir en varios lugares diferentes a la vez. En una realización no limitante, las inserciones pueden ser del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos, mientras que las eliminaciones pueden variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 30

residuos. Las eliminaciones o inserciones pueden realizarse en pares adyacentes (por ejemplo, una supresión de aproximadamente 2 residuos o la inserción de aproximadamente 2 residuos). Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a una construcción final. Las mutaciones no pueden colocar la secuencia fuera del marco de lectura y no deben crear regiones complementarias que puedan producir una estructura secundaria de ARNm. Las variantes de sustitución son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo y se ha insertado un residuo diferente en su lugar.

Se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que pueden producir los mayores cambios en las propiedades de las proteínas serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, está sustituido por (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, está sustituido por (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o por) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) aumentando el número de sitios para sulfuración y/o glicosilación.

La presente descripción proporciona variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos pueden ser cuando la secuencia mantiene al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Por ejemplo, se pueden utilizar reemplazos conservadores de aminoácidos. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales, en donde la intercambiabilidad de los residuos tiene cadenas laterales similares.

Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) los aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrofóbicos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo, tales como serina y treonina; (ii) un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida, tales como asparagina y glutamina; (iii) un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (iv) un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas, tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; y (v) un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre, tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores útiles son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Por ejemplo, el reemplazo de un residuo de aminoácido con otro que es biológicamente y/o químicamente similar es conocido por los expertos en la técnica como una sustitución conservadora. Por ejemplo, una sustitución conservadora estaría reemplazando un residuo hidrofóbico por otro, o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gin; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. La mutagénesis de sustitución o de eliminación puede emplearse para insertar sitios para N-glucosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glucosilación (Ser o Thr). Las eliminaciones de cisteína u otros residuos lábiles también pueden ser deseables. Eliminaciones o sustituciones de sitios potenciales de proteólisis. Por ejemplo, Arg, se logra, por ejemplo, eliminando uno de los residuos básicos o sustituyendo uno por residuos de glutamilo o histidilo.

Sistemas de expresión bacteriana y de levadura. En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar varios vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de una proteína codificada por un gen, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, para la inducción de anticuerpos, se pueden utilizar vectores que dirigen una expresión de alto nivel de proteínas que se purifican fácilmente. Ejemplos no limitantes de tales vectores incluyen vectores de clonación y expresión de E. coli multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene). Los vectores pIN o vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) también pueden usarse para expresar moléculas de polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguidas de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas elaboradas en tales sistemas pueden diseñarse para incluir sitios de escisión de proteasa de heparina, trombina o factor Xa para que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto GST a voluntad.

Sistemas de expresión de plantas e insectos. Si se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser dirigida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, los promotores virales como los promotores 35S y 19S de CaMV pueden usarse solos o en combinación con

la secuencia líder omega de TMV. Alternativamente, pueden usarse promotores de plantas tales como la pequeña subunidad de RUBISCO o promotores de choque térmico. Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o mediante transfección mediada por patógenos.

Un sistema de insecto también puede usarse para expresar proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Por ejemplo, en uno de estos sistemas, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican un polipéptido de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden clonarse en una región no esencial del virus, como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de secuencias de ácido nucleico, como una secuencia correspondiente a un gen, como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, hará que el gen de polihedrina esté inactivo y produzca virus recombinante que carece de proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se puede expresar la proteína o una variante de la misma.

Sistemas de expresión de mamíferos. Un vector de expresión puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 unido a al menos una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula huésped. Se pueden usar varios sistemas de expresión basados en virus para expresar una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una variante de la misma en células huésped de mamífero. Por ejemplo, si se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican una proteína se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que comprende el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral se puede usar para obtener un virus viable que expresa una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en células huésped infectadas. Los potenciadores de la transcripción, como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), también se pueden usar para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

Las secuencias reguladoras son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse para dirigir la expresión de una proteína o polipéptido de interés en una célula huésped apropiada como se describe en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990). Ejemplos no limitantes de secuencias reguladoras incluyen: señales de poliadenilación, promotores (como CMV, ASV, SV40 u otros promotores virales como los derivados del virus del papiloma bovino, el poliovirus y el adenovirus 2 (Fiers, et al., 1973, *Nature* 273: 113; Hager GL, et al., *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(2): 137-41) potenciadores, y otros elementos de control de expresión.

Las regiones potenciadoras, que son aquellas secuencias que se encuentran corriente arriba o corriente abajo de la región promotora en regiones de ADN no codificantes, también son conocidas en la técnica por ser importantes para optimizar la expresión. Si es necesario, se pueden emplear los orígenes de replicación de fuentes virales, como si se utiliza un huésped procariota para la introducción de ADN plasmídico. Sin embargo, en los organismos eucariotas, la integración cromosómica es un mecanismo común para la replicación del ADN.

Para la transfección estable de células de mamífero, una pequeña fracción de células puede integrar el ADN introducido en sus genomas. El vector de expresión y el método de transfección utilizados pueden ser factores que contribuyen a un evento de integración exitoso. Para la amplificación estable y la expresión de una proteína deseada, un vector que contiene ADN que codifica una proteína de interés se integra de manera estable en el genoma de las células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, como las células del bulbo final del folículo piloso), lo que da como resultado expresión estable de genes transfectados. Se puede introducir una secuencia de ácidos nucleicos exógeno en una célula (tal como una célula de mamífero, ya sea una célula primaria o secundaria) mediante recombinación homóloga como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,641,670.

Un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos o fármacos, como ampicilina, neomicina, G418 e higromicina) puede introducirse en células huésped junto con el gen de interés para identificar y seleccionar clones que expresan de forma estable un gen que codifica una proteína de interés. El gen que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo plásmido que el gen de interés o puede introducirse en un plásmido separado. Las células que contienen el gen de interés pueden identificarse mediante la selección del fármaco en el que las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán en presencia del fármaco. Las células que no han incorporado el gen para el marcador seleccionable mueren. Las células supervivientes pueden seleccionarse para la producción de la molécula de proteína deseada (por ejemplo, una proteína codificada por un gen, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2).

Transfección celular

Se puede usar un vector de expresión eucariota para transfectar células para producir proteínas codificadas por secuencias de nucleótidos del vector. Las células de mamífero (como las células aisladas del bulbo piloso; por ejemplo, las células de la vaina dérmica y las células de la papila dérmica) pueden contener un vector de expresión (por ejemplo, uno que contiene un gen que codifica una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o polipéptido) mediante la introducción del vector de expresión en una célula huésped apropiada mediante métodos conocidos en la técnica.

Se puede elegir una cepa de la célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado codificado por un gen, tal como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccion que escinde una forma "prepro" del polipéptido también puede usarse para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Las diferentes células huésped que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades postraduccionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38) están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209) y puede elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.

Se puede introducir un ácido nucleico exógeno en una célula mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como lipofección, microinyección, precipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación. La electroporación se lleva a cabo a un voltaje y capacitancia aproximados para dar como resultado la entrada de las construcciones de ADN en las células de interés (como las células del bulbo terminal de un folículo piloso, por ejemplo, las células de la papila dérmica o las células de la vaina dérmica). Otros métodos de transfección también incluyen precipitación de fosfato de calcio modificada, precipitación de polibreno, fusión de liposomas y administración de genes mediada por receptores.

Las células que serán manipuladas genéticamente pueden ser células primarias y secundarias obtenidas de diversos tejidos, e incluyen tipos de células que pueden mantenerse y propagarse en cultivo. Ejemplos no limitantes de células primarias y secundarias incluyen células epiteliales (por ejemplo, células de la papila dérmica, células del folículo piloso, células de la vaina de la raíz interna, células de la vaina de la raíz externa, células de la glándula sebácea, células de la matriz epidérmica), células neurales, células endoteliales, células gliales, fibroblastos, células musculares (como los mioblastos) queratinocitos, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de la médula ósea) y precursores de estos tipos de células somáticas.

El tejido de vertebrados se puede obtener mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, tales como biopsia por punción u otros métodos quirúrgicos para obtener una fuente de tejido del tipo de célula primaria de interés. En una realización, se puede usar una biopsia por punción o extracción para obtener una fuente de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales o células mesenquimales (por ejemplo, células del folículo piloso o células de la papila dérmica). En otra realización, la extracción de un folículo piloso puede usarse para obtener una fuente de fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales o células mesenquimales (por ejemplo, células del folículo piloso o células de la papila dérmica). Se puede obtener una mezcla de células primarias del tejido, utilizando métodos fácilmente practicados en la técnica, tales como explantación o digestión enzimática (por ejemplo, utilizando enzimas tales como pronasa, tripsina, colagenasa, elastasa dispasa y quimotripsina). También se describen métodos de biopsia en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2004/0057937 y la Publicación de Solicitud PCT WO 2001/32840.

Las células primarias se pueden adquirir del individuo al que se administran las células primarias o secundarias genéticamente modificadas. Sin embargo, las células primarias también se pueden obtener de un donante, que no sea el receptor, de la misma especie. Las células también se pueden obtener de otra especie (por ejemplo, conejo, gato, ratón, rata, oveja, cabra, perro, caballo, vaca, ave o cerdo). Las células primarias también pueden incluir células de una fuente de tejido de vertebrado aislada cultivada unida a un sustrato de cultivo de tejido (por ejemplo, matriz o placa) o cultivada en una suspensión; células presentes en un explante derivado de tejido; los dos tipos de células mencionados anteriormente se platearon por primera vez; y suspensiones de cultivo celular derivadas de estas células en placa. Las células secundarias pueden ser células primarias en placa que se eliminan del sustrato de cultivo y se vuelven a colocar, o se pasan, además de las células de los pasajes posteriores. Las células secundarias pueden pasarse una o más veces. Estas células primarias o secundarias pueden contener vectores de expresión que tienen un gen que codifica una proteína de interés (por ejemplo, una proteína o polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2).

Cultivo celular

Se pueden usar diversos parámetros de cultivo con respecto a la célula huésped que se está cultivando. Las condiciones de cultivo apropiadas para células de mamífero son bien conocidas en la técnica (Cleveland WL, et al., J Immunol Methods, 1983, 56(2): 221-234) o pueden ser determinadas por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Animal Cell Culture: A Practical Approach 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, BD, eds. (Oxford University Press: Nueva York, 1992). Las condiciones de cultivo celular pueden variar según el tipo de célula huésped seleccionada. Se puede utilizar medio comercialmente disponible. Ejemplos no limitativos de medio incluyen, por ejemplo, Medio Mínimo Esencial (MEM, Sigma, St. Louis, MO); Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); medio de Ham F10 (Sigma); Medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, Utah); Medio RPMI-1640 (Sigma); y medios definidos químicamente (CD), que están formulados para diversos tipos de células, por ejemplo, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los medios de cultivo celular pueden complementarse según sea necesario con componentes o ingredientes suplementarios, que incluyen componentes opcionales, en concentraciones o cantidades apropiadas, según sea necesario o deseado. Las soluciones de medio de cultivo celular proporcionan al menos un componente de una o más

de las siguientes categorías: (1) una fuente de energía, generalmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa; (2) todos los aminoácidos esenciales, y generalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína; (3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones; (4) ácidos grasos libres o lípidos, por ejemplo ácido linoleico; y (5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos naturales que pueden requerirse a concentraciones muy bajas, generalmente en el rango micromolar.

El medio también se puede suplementar electivamente con uno o más componentes de cualquiera de las siguientes categorías: (1) sales, por ejemplo, magnesio, calcio y fosfato; (2) hormonas y otros factores de crecimiento tales como suero, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico; (3) hidrolizados de proteínas y tejidos, por ejemplo peptona o mezclas de peptonas que se pueden obtener a partir de gelatina purificada, material vegetal o subproductos animales; (4) nucleósidos y bases tales como adenosina, timidina e hipoxantina; (5) reguladores, como HEPES; (6) antibióticos, como gentamicina o ampicilina; (7) agentes protectores de células, por ejemplo poliol plurónico; y (8) galactosa. En una realización, se pueden agregar factores solubles al medio de cultivo.

El cultivo de células de mamífero que puede usarse con la presente descripción se prepara en un medio adecuado para el tipo de célula que se cultiva. En una realización, el medio de cultivo celular puede ser cualquiera de los discutidos previamente (por ejemplo, MEM) que se complementa con suero de una fuente de mamífero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS)). En otra realización, el medio puede ser un medio acondicionado para sostener el crecimiento de células epiteliales o células obtenidas del bulbo piloso de un folículo piloso (tales como células de la papila dérmica o células de la vaina dérmica). Por ejemplo, las células epiteliales se pueden cultivar de acuerdo con Barnes y Mather en *Animal Cell Culture Methods* (Academic Press, 1998). En una realización adicional, las células epiteliales o las células del folículo piloso pueden transfectarse con vectores de ADN que contienen genes que codifican un polipéptido o proteína de interés (por ejemplo, una proteína o polipéptido Jak 1 Jak 2, Stat 1 o Stat 2). En otras realizaciones, las células se cultivan en un cultivo en suspensión (por ejemplo, un cultivo tridimensional tal como un cultivo en gota colgante) en presencia de una cantidad efectiva de enzima, en donde el sustrato enzimático es una molécula de matriz extracelular en el cultivo en suspensión. Por ejemplo, la enzima puede ser una hialuronidasa. Las células epiteliales o las células del folículo piloso se pueden cultivar de acuerdo con métodos practicados en la técnica, por ejemplo, como los descritos en la Publicación de Solicitud PCT WO 2004/044188 y en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2005/0272150, o según lo descrito por Harris en el *Manual in Practical Animal Cell Biology: Epithelial Cell Culture* (Cambridge Univ. Press, Gran Bretaña; 1996; véase Capítulo 8).

Un cultivo en suspensión es un tipo de cultivo en el que las células, o agregados de células (tales como agregados de células DP), se multiplican mientras se suspenden en medio líquido. Un cultivo en suspensión que comprende células de mamífero puede usarse para el mantenimiento de tipos de células que no se adhieren o para permitir que las células manifiesten características celulares específicas que no se ven en la forma adherente. Algunos tipos de cultivos en suspensión pueden incluir cultivos tridimensionales o un cultivo de gota colgante. Un cultivo de gota colgante es un cultivo en el que el material que se va a cultivar se inocula en una gota de fluido unida a una superficie plana (como un cubreobjetos, portaobjetos de vidrio, placa de Petri, matraz y similares), y se puede invertir sobre una superficie hueca. Las células en una gota colgante pueden agregarse hacia el centro colgante de una gota como resultado de la gravedad. Sin embargo, de acuerdo con los métodos descritos aquí, las células cultivadas en presencia de una proteína que degrada la matriz extracelular (como colagenasa, condroitinasa, hialuronidasa y similares) se volverán más compactas y agregadas dentro del cultivo de gotas colgantes, la degradación de la ECM permitirá que las células se acerquen entre sí, ya que habrá menos ECM presente. Véase también la Publicación Internacional PCT No. WO2007/100870.

Las células obtenidas del bulbo piloso de un folículo piloso (como las células de la papila dérmica o las células de la vaina dérmica) se pueden cultivar como una población única y homogénea (por ejemplo, que comprende células DP) en un cultivo de gotas colgantes para generar un agregado de células DP. Las células también se pueden cultivar como una población heterogénea (por ejemplo, que comprende células DP y DS) en un cultivo de gotas colgantes para generar un agregado quimérico de células DP y DS. Las células epiteliales se pueden cultivar como una monocapa a la confluencia como se practica en la técnica. Dichos métodos de cultivo pueden llevarse a cabo esencialmente de acuerdo con los métodos descritos en el Capítulo 8 del *Handbook in Practical Animal Cell Biology: Epithelial Cell Culture* (Cambridge Univ. Press, Gran Bretaña; 1996); Underhill CB, *J Invest Dermatol*, 1993, 101(6): 820-6; en Armstrong and Armstrong, (1990) *J Cell Biol* 110: 1439-55; o en *Animal Cell Culture Methods* (Academic Press, 1998).

Los cultivos tridimensionales pueden formarse a partir de agar (tal como el agar de Gey), hidrogeles (tales como matrigel, agarosa y similares; Lee et al., (2004) *Biomaterials* 25: 2461-2466) o polímeros que están entrecruzados. Estos polímeros pueden comprender polímeros naturales y sus derivados, polímeros sintéticos y sus derivados, o una combinación de los mismos. Los polímeros naturales pueden ser polímeros aniónicos, polímeros catiónicos, polímeros anfipáticos o polímeros neutros. Ejemplos no limitativos de polímeros aniónicos pueden incluir ácido hialurónico, ácido alginico (alginato), carragenano, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano y pectina. Algunos ejemplos de polímeros catiónicos incluyen, entre otros, quitosano o polilisina. (Peppas et al., (2006) *Adv Mater.* 18: 1345-60; Hoffman, A.S., (2002) *Adv Drug Deliv Rev.* 43: 3-12; Hoffman, A.S., (2001) *Ann NY Acad Sci* 944: 62-73). Ejemplos de polímeros anfipáticos pueden incluir, entre otros, colágeno, gelatina, fibrina y carboximetil quitina. Ejemplos no limitativos de

polímeros neutros pueden incluir dextrano, agarosa o pululano. (Peppas et al., (2006) Adv Mater. 18: 1345-60; Hoffman, A.S., (2002) Adv Drug Deliv Rev. 43: 3-12; Hoffman, A.S., (2001) Ann NY Acad Sci 944: 62 -73).

Las células adecuadas para el cultivo de acuerdo con los métodos descritos aquí pueden albergar vectores de expresión introducidos, tales como plásmidos. Las construcciones del vector de expresión se pueden introducir mediante transformación, microinyección, transfección, lipofección, electroporación o infección. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de codificación, o porciones de las mismas, que codifican las proteínas para expresión y producción. Los vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y polipéptidos producidos, así como los elementos de control de transcripción y traducción apropiados, pueden generarse usando métodos bien conocidos y practicados por los expertos en la materia. Estos métodos incluyen técnicas sintéticas, técnicas de ADN recombinante in vitro y recombinación genética in vivo que se describen en J. Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY y en FM Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

Obtención y purificación de polipéptidos

Una molécula de polipéptido codificada por un gen, tal como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o una variante del mismo, puede obtenerse mediante purificación a partir de células humanas que expresan una proteína o polipéptido codificado por un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 mediante expresión in vitro o in vivo de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2; o por síntesis química directa.

Detección de la expresión del polipéptido. Las células huésped que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, y que posteriormente expresan una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, pueden identificarse mediante diversos procedimientos. conocido por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, entre otros, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en chips, membranas o soluciones para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos o proteínas. Por ejemplo, la presencia de un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede detectarse mediante hibridación o amplificación de ADN-ADN o ADN-ARN usando sondas o fragmentos de ácidos nucleicos que codifican una Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 proteína o polipéptido. En una realización, un fragmento de un ácido nucleico de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8. En otra realización, el fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8. Los fragmentos pueden incluir todas las longitudes posibles de nucleótidos entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los ensayos basados en amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados de secuencias que codifican un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 para detectar transformantes que contienen un ácido nucleico que codifica un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 proteínas o polipéptidos.

Los protocolos para detectar y medir la expresión de un polipéptido codificado por un gen, tal como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido están bien establecidos. Ejemplos no limitantes incluyen el ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se puede usar un inmunoensayo monoclonal de dos sitios que usa anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes en un polipéptido codificado por un gen, como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o se puede emplear un ensayo de unión competitiva.

Las técnicas de marcado y conjugación son conocidas por los expertos en la técnica y pueden usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los métodos para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, incluyen, pero no se limitan a, oligoetiquetado, traducción de muesca, etiquetado final, o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido codificado por un gen, como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN in vitro mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo utilizando una variedad de kits disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Promega y US Biochemical). Las moléculas o etiquetas indicadoras adecuadas que pueden usarse para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores y/o partículas magnéticas.

Expresión y purificación de polipéptidos. Las células huésped transformadas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada se

puede secretar o contener intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. Los vectores de expresión que contienen una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, pueden diseñarse para contener secuencias de señal que dirijan la secreción de moléculas de polipéptidos solubles codificadas por un gen, como Jak 1, Jak 2, el gen Stat 1 o Stat 2, o una variante del mismo, a través de una membrana celular procariota o eucariota o que dirigen la inserción de la membrana de una molécula de polipéptido unida a la membrana codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una variante en esto.

Se pueden usar también otras construcciones para unir una secuencia génica que codifica un polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles. Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación de afinidad/extensión de FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Washington). Incluyendo secuencias enlazadoras escindibles (es decir, aquellas específicas para Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, California)) entre el dominio de purificación y un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 también se puede usar para facilitar la purificación. Uno de tales vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y 6 residuos de histidina que preceden a un sitio de escisión de tiorredoxina o enteroquinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados, mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2.

Un polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se puede purificar de cualquier célula humana o no humana que exprese el polipéptido, incluidas las que se han transfectado con construcciones de expresión que expresan un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o proteína Stat 2. Una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 purificada se puede separar de otros compuestos que normalmente se asocian con una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula, como ciertas proteínas, carbohidratos, o lípidos, utilizando métodos practicados en la técnica. Los métodos no limitantes incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparativa.

Síntesis química. Las secuencias de ácido nucleico que comprenden un gen, tal como un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, que codifica un polipéptido pueden sintetizarse, total o parcialmente, usando métodos químicos conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede producir un polipéptido, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como por síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida. La síntesis de proteínas puede realizarse utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de polipéptidos Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se pueden sintetizar y combinar por separado utilizando métodos químicos para producir una molécula de longitud completa. En una realización, un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8. En una realización, el fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos o al menos aproximadamente 30 nucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8. Los fragmentos incluyen todas las posibles longitudes de nucleótidos entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 nucleótidos.

Un fragmento Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser un fragmento de una proteína, como Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Por ejemplo, Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 el fragmento puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 70 aminoácidos consecutivos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre aproximadamente 8 y 100 aproximadamente aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos ácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos.

Un péptido sintético puede purificarse sustancialmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La composición de un polipéptido sintético de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede confirmarse mediante análisis de aminoácidos o secuenciación. Además, cualquier porción de una secuencia de aminoácidos que comprende una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o una proteína de fusión.

Identificación de compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2

La divulgación se refiere a métodos para identificar compuestos que pueden usarse para controlar y/o regular el crecimiento del cabello (por ejemplo, la densidad del cabello) o la pigmentación del cabello en un sujeto. Dado que la divulgación ha proporcionado la identificación de los genes enumerados aquí como genes asociados con un trastorno de pérdida de cabello, la divulgación también proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la expresión o actividad de un gen y/o proteína de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Además, la divulgación proporciona métodos para identificar compuestos que pueden usarse para el tratamiento de un trastorno de pérdida de cabello. La divulgación también se refiere a métodos para identificar compuestos que pueden usarse para el tratamiento de la hipotricosis (por ejemplo, hipotricosis simple hereditaria (HHS)). Ejemplos no limitantes de trastornos de pérdida de cabello incluyen: alopecia androgenética, alopecia areata, efluvio telógeno, alopecia areata, alopecia total y alopecia universal. Los métodos pueden comprender la identificación de compuestos o agentes de prueba (por ejemplo, péptidos (como anticuerpos o fragmentos de los mismos), moléculas pequeñas, ácidos nucleicos (como ARNs o ARN antisentido) u otros agentes) que pueden unirse a una molécula de polipéptido codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y/o tienen un efecto estimulante o inhibidor sobre la actividad biológica de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o su expresión, y posteriormente determinar si estos compuestos pueden regular el crecimiento del cabello en un sujeto o pueden tener un efecto sobre los síntomas asociados con los trastornos de pérdida de cabello en un ensayo in vivo (es decir, examinar un aumento o reducción en el crecimiento del cabello).

Tal como se usa en el presente documento, un "compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o proteína o polipéptido Stat 2 y modula su actividad y/o su expresión. El compuesto puede aumentar la actividad o la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Por el contrario, el compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. El compuesto puede ser un agonista de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o un antagonista de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 (por ejemplo, un inhibidor de Jak1, un inhibidor de Jak2, un inhibidor de Stat1 o un inhibidor de Stat2). Algunos ejemplos no limitantes de compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 incluyen péptidos (como fragmentos de péptidos que comprenden un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o anticuerpos o fragmentos de los mismos), moléculas pequeñas y ácidos nucleicos (como ARNs o ARN antisentido específicos para un ácido nucleico que comprende un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2). Los agonistas de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden ser moléculas que, cuando se unen a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, aumentan o prolongan la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Los agonistas de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 incluyen, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que active una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Los antagonistas de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden ser moléculas que, cuando se unen a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, disminuyen la cantidad o la duración de la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que disminuya la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2.

El término "modular", como aparece aquí, se refiere a un cambio en la actividad o expresión de un gen o proteína de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Por ejemplo, la modulación puede causar un aumento o una disminución de la actividad proteica, las características de unión o cualquier otra propiedad biológica, funcional o inmunológica de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2.

En una realización, un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser un fragmento peptídico de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que se une a la proteína. Por ejemplo, el polipéptido Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 consecutivos aminoácidos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o b entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos de péptidos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse a través de métodos de síntesis en fase líquida o en fase sólida (Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra). Los fragmentos peptídicos Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden aislarse de una fuente natural, manipulados genéticamente o preparados químicamente. Estos métodos son bien conocidos en la técnica.

Un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser una proteína, tal como un anticuerpo (monoclonal, policlonal, humanizado, quimérico o completamente humano), o un fragmento de unión del mismo, dirigido contra un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Un fragmento de anticuerpo puede ser una forma de un

anticuerpo diferente a la forma de longitud completa e incluye porciones o componentes que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, además de los fragmentos de anticuerpos que han sido diseñados. Los fragmentos de anticuerpos pueden incluir, entre otros, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, Fv y (Fab')₂, triacuerpos, Fc, Fab, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, regiones marco, regiones constantes y similares (véase, Maynard et al., (2000) Ann. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76; Hudson (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395-402). Los anticuerpos pueden obtenerse comercialmente, generarse a medida o sintetizarse contra un antígeno de interés de acuerdo con los métodos establecidos en la técnica (Janeway et al., (2001) Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing). En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo se dirige contra la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Los anticuerpos pueden obtenerse comercialmente, generarse a medida o sintetizarse contra un antígeno de interés de acuerdo con los métodos establecidos en la técnica (Janeway et al., (2001) Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing). Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden obtenerse comercialmente de Abcam, Santa Cruz Biotechnology, Abnova Corp., BD Biosciences, Antigenix America Inc., etc. Los anticuerpos humanos dirigidos a Jak 1, Jak 2, Stat 1, o Stat 2 (como los anticuerpos monoclonales, humanizados o quiméricos) pueden ser terapias de anticuerpos útiles para uso en humanos.

La inhibición del ARN que codifica un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede modular efectivamente la expresión de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 a partir del cual se transcribe el ARN. Los inhibidores se seleccionan del grupo que comprende: ARNsi; ARN interferente o ARNi; ARNds; ADN transcrito de ARN polimerasa III; ribozimas; y ácidos nucleicos antisentido, que pueden ser ARN, ADN o un ácido nucleico artificial.

Los oligonucleótidos antisentido, que incluyen moléculas de ADN, ARN y ADN/ARN antisentido, actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm uniéndose al ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante técnicas convencionales de fosfodiéster (Dallas et al. al., (2006) Med. Sci. Monit. 12(4): RA67-74; Kalota et al., (2006) Handb. Exp. Pharmacol. 173: 173-96; Lutzelburger et al., (2006) Handb. Exp. Pharmacol. 173: 243-59). Las secuencias de nucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolidos, polinucleótidos de 2'-O-metilo, ADN, ARN y similares.

El ARNsi comprende una estructura bicatenaria que contiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 pares de bases, por ejemplo de aproximadamente 21 a aproximadamente 25 pares de bases, y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen o ARN objetivo expresado dentro de la célula. El ARNsi comprende una cadena de ARN con sentido y una cadena de ARN antisentido complementaria recocida por interacciones estándar de emparejamiento de bases Watson-Crick. La cadena sentido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos contenida dentro de la molécula de miARN diana. "Sustancialmente idéntico" a una secuencia objetivo contenida dentro del ARNm objetivo se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que difiere de la secuencia objetivo en aproximadamente un 3% o menos. Las cadenas sentido y antisentido del ARNsi pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias, o pueden comprender una molécula única en la que dos porciones complementarias están emparejadas con bases y están unidas covalentemente por un área de "horquilla" monocatenaria. Véase también, McMnaus and Sharp (2002) Nat Rev Genetics, 3: 737-47, y Sen and Blau (2006) FASEB J., 20: 1293-99.

El ARNsi puede ser ARN alterado que difiere del ARN natural mediante la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, como el (los) extremo(s) del ARNsi o uno o más nucleótidos internos del ARNsi, o modificaciones que hacen que el ARNsi sea resistente a la digestión de nucleasas, o la sustitución de uno o más más nucleótidos en el ARNsi con desoxirribonucleótidos. Una o ambas cadenas del ARNsi también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa en el presente documento, un saliente 3' se refiere a al menos un nucleótido no apareado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN duplicado. Por ejemplo, el ARNsi puede comprender al menos un saliente 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, o de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, o de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del ARNsi puede comprender voladizos 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

El ARNsi puede producirse química o biológicamente, o puede expresarse a partir de un plásmido recombinante o un vector viral (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 7,294,504 y la Patente de los Estados Unidos No. 7,422,896). Métodos ejemplares para producir y probar moléculas de ARNds o ARNsi se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2002/0173478 a Gewirtz, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2007/0072204 a Hannon et al., y en la Publicación de Solicitud de Patente los Estados Unidos No. 2004/0018176 a Reich et al.

En una realización, se puede generar un ARNsi dirigido a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 contra cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 4, 6 u 8. En otra realización, un ARNsi dirigido a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende un gen Jak 1 puede comprender cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 11. En otra realización, un ARNsi dirigido a una secuencia de ácidos nucleicos humana que comprende un gen Stat 1 puede comprender cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 12.

En otra realización, el ARNsi dirigido a Jak 1 se enumera en la Tabla 11.

Tabla 11.

Secuencias de ARNsi para Jak1	
CCACATAGCTGATCTGAAA CGGGAAGCCTTAAGGAATA CTGAAGAGAAGAAGATAAA ACAAGAAGGATGAGGAGAA CCAAGAAGACTGAGGTGAA CAGAATACGCCATCAATAA GCACAGAAGACGGAGGAAA GCGATATATTCCAGAAACA TGAGCTACTTGGAGGATAA GAGTGAACACCAAGTGAAA CAAGAAGGATGAGGAGAAA CGGGAAGAGTGGAACAATT GCATTAACAAGCAGGACAA TTTGGAAAGTAGAGAAGAA GGAAAGTAGAGAAGAAAAT GGAACCACGCTCTGGGAAA TGATTGAGAAAGAGAGATT ACATTACGGTGCTGAAATA GGGAAGAGTGGAACAATTT AGAATATCATGGTGGAAGA GGAAATGTGTGTACTAAAA ATGAGAACATTGTGAAGTA CACAGAAGACGGAGGAAAT GCTGGTGGCTACTAAGAAA	TCTGAAGAGAAGAAGATAA GCAAGAATGCATTGAACGA AAGAAAGATTGATGGACTT AAAATAAACTGAAGCGGAA ATGAGGAAATGCTGGGAAT AAAGAAAGATTGATGGACT GGACTTAGCCCTCAAATTT ACACTGGACAGCTGAATAA CTGAATAAATGCAGTATCT AAGAATGCATTGAACGAAT CCAGTAACTTAGTGACACA TTAACAAGCAGGACAACAA GGGAGCAGGTGGCTGTAA AAATCGAGATCTTAAGGAA GGAAATGGTATTAAGCTCA CCAGAATGTTTAATGCAAT GGACAAGCTTTCAGAACCT ACACATAATGACAACCAA GCTTGGAGGTAGCTGGGTA CAGCAGAGGAACTGTGCAT CCAGAAACATTGAATAAGT CTGAAATATTTGAGACTTC GTACAGAATACGCCATCAA GCACCGACTTTGACAACAT GAGAAGAAGATAAAAAGTGA GGAAATTCAAAGTTGCCAA

En otra realización, el ARNsi dirigido a Stat1 se enumera en la Tabla 12.

Tabla 12.

Secuencias de ARNsi para Stat1	
AGAAAGAGCTTGACAGTAA	TGAAATTGCAAGAGCTGAA
AGGAATTGGAACAGAAATA	AGAAATACACCTACGAACA
CAGCATAACATAAGGAAAA	CCCTAAAGGAACTGGATAT
TCAGAAATGTGAAGGACAA	GGAGGAATTGGAACAGAAA
GGCAAAGAGTGATCAGAAA	CCTAAAGGAACTGGATATA
GCACAGTGATGTTAGACAA	AGCGTAATCTTCAGGATAA
AGTCATGGCTGCTGAGAAT	TCTGAAGGAAGAAAGGAAA
GTATAGAGCATGAAATCAA	GGAAGATTTACAAGATGAA
GGTTATGTGTATAGAGCAT	TGGCAAAGAGTGATCAGAA
GAAAGGAAGTAGTTCACAA	AGAGAAAGGAAGTAGTTCA
GATGTGAATGAGAGAAATA	TAATAGAGTTGCTGAATGT
ACAGAGAACACGAGACCAA	TGGAGGAATTGGAACAGAA
AAGATGTGAATGAGAGAAA	AGTTGAGACTGTTGGTGAA
AGGACAAGGTTATGTGTAT	GATAAAGATGTGAATGAGA
CCTGATTAATGATGAACTA	CATCGTTACTGAAGAGCTT
ACACAAAAGTGATGAACAT	TGAAGTATCTGTATCCAAA
GCAATTGAAAGAACAGAAA	GCACAAGGTGGCAGGATGT
CGAGAGCTGTCTAGGTTAA	TGTCACAGCTGGATGATCA
GAACATGACCCTATCACAA	GAAAGAGCTTGACAGTAAA
AGACAAACAGAAAGAGCTT	TCAAGAGCCTGGAAGATTT
GGACAAGGTTATGTGTATA	TGGAAGATTTACAAGATGA
TGACAATAAGAGAAAGGAA	ATGAACTAGTGGAGTGGA
GGAAGTAGTTCACAAAATA	TGAGACTGTTGGTGAAATT
	TTGCAAGAGCTGAATTATA
	GGATTTAGGAAGTTCAACA
	GGAAGTTGATGGCCCTAAA
	GGAAGTTGATATATCAAGA

Los ADN transcritos con ARN polimerasa III contienen promotores, tales como el promotor U6. Estos ADN se pueden transcribir para producir pequeños ARN en horquilla en la célula que pueden funcionar como ARNsi o ARN lineales que pueden funcionar como ARN antisentido. El compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o cualquier combinación adecuada de manera que se

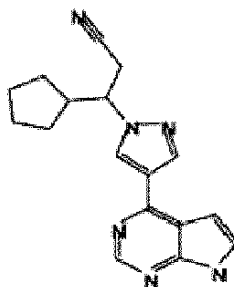
inhiba el ARN y/o gen diana. Además, estas formas de ácido nucleico pueden ser de cadena simple, doble, triple o cuádruple (véase, por ejemplo, Bass (2001) *Nature*, 411, 428-429; Elbashir et al., (2001) *Nature*, 411, 494-498; y las Publicaciones PCT Nos. WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 00/01846, WO 01/29058, WO 99/07409, WO 00/44914).

Un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser una molécula pequeña que se une a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y altera su función, o, por el contrario, mejora su función. Las moléculas pequeñas son un grupo diverso de sustancias sintéticas y naturales que generalmente tienen pesos moleculares bajos. Se pueden aislar de fuentes naturales (por ejemplo, plantas, hongos, microbios y similares), se obtienen comercialmente y/o están disponibles como bibliotecas o colecciones, o se sintetizan. Las moléculas pequeñas candidatas que modulan una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se pueden identificar mediante detección *in silico* o detección de alto rendimiento (HTP) de bibliotecas combinatorias. La mayoría de los productos farmacéuticos convencionales, como la aspirina, la penicilina y muchos quimioterapéuticos, son moléculas pequeñas, se pueden obtener comercialmente, se pueden sintetizar químicamente o se pueden obtener de bibliotecas aleatorias o combinatorias como se describe a continuación (Werner et al., (2006) *Brief Funct. Genomic Proteomic* 5(1): 32-6).

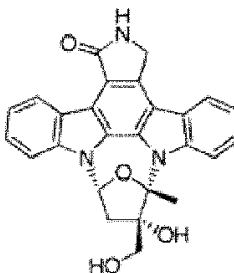
Ejemplos no limitantes de inhibidores de Jak1/Jak2 incluyen: AG490 (Cáceres-Cortes, *Anticancer Agents Med Chem.* 2008 Oct; 8(7): 717-22); CYT387 (Pardanani et al., *Leukemia*. 2009 Aug; 23(8): 1441-5; Monaghan et al., *Leukemia*. 2011 Jul 26. doi: 10.1038/leu.2011.175. [Epub ahead of print]); SB1518 (William et al., *J Med Chem.* 2011 14 de julio; 54 (13): 4638-58; Hart et al., *Leukemia*. 2011 21 de junio. Doi: 10.1038/leu.2011.148. [Epub antes de la impresión]); LY3009104 (INCB28050) (Incyte and Lilly); TG101348 (Wernig et al., *Cancer Cell*. 2008 Apr; 13(4): 311-20; Pardanani et al., *J Clin Oncol.* 2011 Mar 1; 29(7): 789-96); y BMS-911543 (Purandare et al., *Leukemia*. 2011, Oct. 21. doi: 10.1038/leu.2011.292. [Epub antes de la impresión]).

Los inhibidores de JAK1/2 en el desarrollo clínico incluyen a) INCB018424, tópico y oral; Actividad 5nM (Incyte); b) CEP-701 (Cephalon); y c) TG101348.

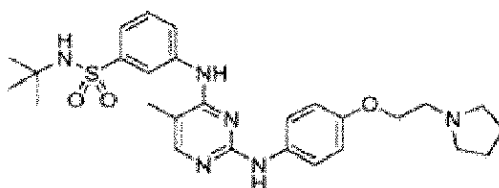
a)



b)



c)



Ejemplos no limitantes de inhibidores de Stat incluyen: WP-1034 (Faderl et al., *Anticancer Res.* 2005 May-Jun; 25(3B): 1841-50), fludarabina (Fludara, Berlex, CA), epigallocatequina-3-galato (EGCG) e hiperforina. Otros compuestos dirigidos a la señalización Jak/Stat se describen en Ivanenkov et al., *Mini Rev Med Chem.* 2011 Jan; 11(1): 55-78.

El conocimiento de la secuencia primaria de una molécula de interés, tal como un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, y la similitud de esa secuencia con proteínas de función conocida, puede proporcionar información sobre los inhibidores o antagonistas de la proteína de interés además de los agonistas. La identificación y detección de agonistas y antagonistas se facilita aún más mediante la determinación de las características estructurales de la proteína, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X, difracción de neutrones, espectrometría de resonancia magnética nuclear y otras técnicas para la determinación de la estructura. Estas técnicas proporcionan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

Los compuestos de prueba, tales como los compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, pueden seleccionarse de grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales (véase Wang et al., (2007) *Curr Med Chem*, 14(2): 133-55; Mannhold (2006) *Curr Top Med Chem*, 6(10): 1031-47; y Hensen (2006) *Curr Med Chem* 13(4): 361-76). Actualmente se utilizan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de compuestos basados en sacárido, péptido y ácido nucleico. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), AMRI (Albany, NY), ChemBridge (San Diego, CA) y MicroSource (Gaylordsville, CT). Una biblioteca química rara está disponible en Aldrich (Milwaukee, Wisconsin). Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, Wash.) O MycoSearch (N.C.), o son fácilmente producibles. Además, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural y sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales (Blondelle et al., (1996) *Tib Tech* 14:60).

Los métodos para preparar bibliotecas de moléculas son bien conocidos en la técnica y muchas bibliotecas están disponibles comercialmente. Las bibliotecas de interés en la divulgación incluyen bibliotecas de péptidos, bibliotecas de oligonucleótidos aleatorizados, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas y similares. Las bibliotecas de péptidos degenerados se pueden preparar fácilmente en solución, en forma inmovilizada como bibliotecas de presentación de péptidos de flagelos bacterianos o como bibliotecas de presentación de fagos. Los ligandos peptídicos pueden seleccionarse de bibliotecas combinatorias de péptidos que contienen al menos un aminoácido. Se pueden sintetizar bibliotecas de peptoides y unidades estructurales sintéticas no peptídicas. Adicionalmente se pueden sintetizar dichas bibliotecas que contienen unidades estructurales sintéticas no peptídicas, que están menos sujetos a la degradación enzimática en comparación con sus contrapartes naturales. Por ejemplo, las bibliotecas también pueden incluir, entre otras, bibliotecas de péptidos en plásmidos, bibliotecas de moléculas pequeñas sintéticas, bibliotecas de aptámeros, bibliotecas basadas en traducción in vitro, bibliotecas de polisomas, bibliotecas de péptidos sintéticos, bibliotecas de neurotransmisores y bibliotecas químicas.

Se describen ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente en Fodor et al., (1991) *Science* 251: 767-773; Houghten et al., (1991) *Nature* 354: 84-86; Lam et al., (1991) *Nature* 354: 82-84; Medynski, (1994) *BioTechnology* 12: 709-710; Gallop et al., (1994) *J. Medicinal Chemistry* 37(9): 1233-1251; Ohlmeyer et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90: 10922-10926; Erb et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91: 11422-11426; Houghten et al., (1992) *Biotechniques* 13: 412; Jayawickreme et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91: 1614-1618; Salmon et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90: 11708-11712; Publicación PCT No. WO 93/20242, fechada el 14 de octubre de 1993; and Brenner et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89: 5381-5383.

Ejemplos de bibliotecas de presentación en fagos se describen en Scott et al., (1990) *Science* 249: 386-390; Devlin et al., (1990) *Science*, 249: 404-406; Christian et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 711-718; Lenstra, (1992) *J. Immunol.* Metanfetamina 152: 149-157; Kay et al., (1993) *Gene* 128: 59-65; y la Publicación PCT No. WO 94/18318.

Las bibliotecas basadas en traducción in vitro incluyen, pero no se limitan a, las descritas en la Publicación PCT No. WO 91/05058; y Mattheakis et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91: 9022-9026.

Como se usa en este documento, el término "fuente de ligando" puede ser cualquier biblioteca de compuestos descrita en este documento, o extracto de tejido preparado a partir de diversos órganos en el sistema de un organismo, que se puede usar para detectar compuestos que actuarían como un agonista o antagonista de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Las bibliotecas de compuestos de cribado enumeradas en el presente documento [también véase la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2005/0009163, en combinación con estudios en animales in vivo, los ensayos funcionales y de señalización descritos a continuación pueden usarse para identificar compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que regulan el crecimiento del cabello o tratar los trastornos de pérdida de cabello.

La exploración de las bibliotecas se puede lograr mediante cualquier variedad de métodos comúnmente conocidos. Véanse, por ejemplo, las siguientes referencias, que describen el cribado de bibliotecas de péptidos: Parmley and Smith, (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218; Scott and Smith, (1990) *Science* 249:386-390; Fowlkes et al., (1992) *Biotechniques* 13:422-427; Oldenburg et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5393-5397; Yu et al., (1994) *Cell* 76:933-945; Staudt et al., (1988) *Science* 241:577-580; Bock et al., (1992) *Nature* 355:564-566; Tuerk et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6988-6992; Ellington et al., (1992) *Nature* 355:850-852; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,096,815; 5,223,409; y 5,198,346, todas de Ladner et al.; Rebar et al., (1993) *Science* 263:671-673; y Publicación PCT WO 94/18318.

También se pueden generar y seleccionar bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Una biblioteca combinatoria de compuestos orgánicos pequeños es una colección de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad y se sintetizan mediante técnicas orgánicas que utilizan procesos de varios pasos. Las bibliotecas combinatorias incluyen una gran cantidad de compuestos orgánicos pequeños. Se prepara un tipo de biblioteca combinatoria mediante métodos de síntesis paralelos para producir una matriz compuesta. Una matriz compuesta puede ser una colección de compuestos identificables por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y dispuestos de manera que cada compuesto tenga un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variable. Los compuestos en dicha matriz de compuestos se producen en paralelo en recipientes de reacción separados, con cada compuesto identificado y rastreado por su dirección espacial. Se proporcionan ejemplos de mezclas de síntesis paralelas y métodos de síntesis paralelos en U.S. Ser. No. 08/177,497, presentada el 5 de enero de 1994 y su correspondiente Solicitud de Patente PCT publicada WO95/18972, publicada el 13 de julio de 1995 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,712,171 concedida el 27 de enero de 1998 y su correspondiente Solicitud de Patente Publicada PCT WO96/22529.

En un ejemplo no limitante, pueden cribarse bibliotecas no peptídicas, tales como una biblioteca de benzodiazepinas (véase, por ejemplo, Bunin et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4708-4712). También se pueden usar las bibliotecas de peptoides, como la descrita por Simon et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371. Describen otro ejemplo de una biblioteca que se puede usar, en la que las funcionalidades de amida en los péptidos se han permitilado para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 11138-11142.

Las tecnologías de búsqueda y modelado por ordenador permiten la identificación de compuestos, o la mejora de compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Una vez identificado dicho compuesto o composición, los sitios o regiones activos de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden identificarse posteriormente mediante el examen de los sitios a los que se unen los compuestos. Estos sitios pueden ser sitios de unión a ligandos y pueden identificarse utilizando métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de péptidos, las secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos, o el estudio de complejos del compuesto o composición relevante con su ligando natural. En el último caso, se pueden usar métodos cristalográficos químicos o de rayos X para encontrar el sitio activo al encontrar en qué parte del factor se encuentra el ligando complejoado.

La estructura geométrica tridimensional de un sitio, por ejemplo, la de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la cristalografía de rayos X, que puede determinar una estructura molecular completa. La RMN en fase sólida o líquida puede usarse para determinar ciertas distancias intramoleculares. Se puede usar cualquier otro método experimental de determinación de estructura para obtener estructuras geométricas parciales o completas. Las estructuras geométricas se pueden medir con un ligando complejo, natural o artificial, que puede aumentar la precisión de la estructura del sitio activo determinada.

En la técnica se conocen otros métodos para preparar o identificar péptidos que se unen a una diana. La impresión molecular, por ejemplo, se puede utilizar para la construcción de novo de estructuras macromoleculares como los péptidos que se unen a una molécula. Véase, por ejemplo, Kenneth J. Shea, Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo síntesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites, TRIP Vol. 2, No. 5, May 1994; Mosbach, (1994) Trends in Biochem. Sci. 19(9); y Wulff, G., en Polymeric Reagents and Catalysts (Ford, W. T., Ed.), ACS Symposium Series No. 308, págs. 186-230, American Chemical Society (1986). Un método para preparar imitadores de un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 implica los pasos de: (i) polimerización de monómeros funcionales alrededor de un sustrato conocido (la plantilla) que exhibe una actividad deseada; (ii) eliminación de la molécula plantilla; y luego (iii) polimerización de una segunda clase de monómeros en, el vacío dejado por la plantilla, para proporcionar una nueva molécula que exhibe una o más propiedades deseadas que son similares a las de la plantilla. Además de preparar péptidos de esta manera, también se pueden preparar otras moléculas de unión tales como polisacáridos, nucleósidos, fármacos, nucleoproteínas, lipoproteínas, carbohidratos, glucoproteínas, esteroides, lípidos y otros materiales biológicamente activos. Este método es útil para diseñar una amplia variedad de imitaciones biológicas que son más estables que sus contrapartes naturales, ya que se preparan mediante la polimerización por radicales libres de monómeros funcionales, lo que da como resultado un compuesto con un esqueleto no biodegradable. Otros métodos para diseñar tales moléculas incluyen, por ejemplo, el diseño de fármacos basado en relaciones de actividad de estructura, que requieren la síntesis y evaluación de varios compuestos y modelado molecular.

Ensayos de cribado

Compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser un compuesto que afecta la actividad y/o expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 in vivo y/o in vitro. Los compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden ser agonistas y antagonistas de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, y pueden ser compuestos que ejercen su efecto sobre la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 a través de la expresión, a través de modificaciones postraduccionales, o por otros medios.

Los compuestos o agentes de prueba que se unen a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y/o tienen un efecto estimulante o inhibidor sobre la actividad o la expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede identificarse mediante dos tipos de ensayos: (a) ensayos basados en células que utilizan células que expresan una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una variante de la misma en la superficie celular; o (b) ensayos sin células, que pueden hacer uso de proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 aisladas. Estos ensayos pueden emplear un fragmento biológicamente activo de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, proteínas de longitud completa o una proteína de fusión que incluye todo o una porción de un polipéptido codificado por un Jak 1, Jak 2, Gen Stat 1 o Stat 2. Se puede obtener una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 de cualquier especie de mamífero adecuada (por ejemplo, humana, rata, pollo, xenopus, equina, bovina o murina). El ensayo puede ser un ensayo de unión que comprende la medición directa o indirecta de la unión de un compuesto de prueba. El ensayo también puede ser un ensayo de actividad que comprende la medición directa o indirecta de la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. El ensayo también puede ser un ensayo de expresión que comprende la medición directa o indirecta de la expresión de secuencias de ácido nucleico de ARNm de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Los diversos ensayos de detección pueden combinarse con un ensayo in vivo que comprende medir el efecto del compuesto de prueba sobre los síntomas de un trastorno o enfermedad de pérdida de cabello en un sujeto (por ejemplo, alopecia androgenética, alopecia areata, alopecia total o alopecia universal), pérdida de pigmentación del cabello en un sujeto, o incluso hipotricosis.

Un ensayo in vivo también puede comprender evaluar el efecto de un compuesto de prueba sobre la regulación del crecimiento del cabello en modelos de mamíferos conocidos que muestran fenotipos de crecimiento del cabello defectuosos o aberrantes o mamíferos que contienen mutaciones en el marco de lectura abierto (ORF) de secuencias de ácido nucleico que comprende un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que afecta la regulación del crecimiento del cabello o la densidad del cabello, o la pigmentación del cabello. En una realización, controlar el crecimiento del cabello puede comprender una inducción del crecimiento o densidad del cabello en el sujeto. Aquí, el efecto del compuesto en la regulación del crecimiento del cabello puede observarse visualmente mediante el examen del crecimiento o pérdida física del cabello del organismo, o evaluando la expresión de proteínas o ARNm utilizando métodos conocidos en la técnica.

También se pueden realizar ensayos para seleccionar compuestos de prueba que se unen o modulan la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. El compuesto de prueba se puede obtener por cualquier medio adecuado, tal como a partir de bibliotecas de compuestos convencionales. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para unirse a una forma unida a la membrana de la proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se puede lograr mediante el acoplamiento del compuesto de prueba con un radioisótopo o marcador enzimático de tal manera que la unión del compuesto de prueba a la célula que expresa una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se puede medir detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, el compuesto de prueba puede marcarse con ^3H , ^{14}C , ^{35}S o ^{125}I , directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse posteriormente mediante recuento directo de radioemisión o recuento de centelleo. Alternativamente, el compuesto de prueba puede marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático detectado por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

Los ensayos basados en células pueden comprender poner en contacto una célula que expresa Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 con un agente de prueba y determinar la capacidad del agente de prueba para modular (aumentar o disminuir) la actividad o la expresión de la molécula unida a la membrana. La determinación de la capacidad del agente de prueba para modular la actividad de la molécula Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 unida a la membrana se puede lograr mediante cualquier método adecuado para medir la actividad de dicha molécula, como el monitoreo de eventos de señalización corriente abajo (por ejemplo, You et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec; 1150: 300-10; Posadas et al., *Expert Rev Clin Immunol.* 2009 Jan; 5(1): 9-17; Korhonen et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 Apr; 104 (4): 276-84; Vital et al., *Ther Clin Risk Manag.* 2006 Dec; 2(4): 365-75; Malek and Castro, *Inmunidad.* 2010 Aug 27; 33(2): 153-65; Cheng et al., *Immunol Rev.* 2011 May; 241(1): 63-76; Lanier, *Nat Immunol.* 2008 May; 9(5): 495-502; Lowell, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 March 1; 3(3). Pii: a002352; Mócsai et al., *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun; 10(6): 387-402; Bradshaw, *Cell Signal.* 2010 Aug; 22(8): 1175 -84; Ivanenkov et al., *Mini Rev Med Chem.* 2011 Jan; 11(1): 55-78; Himpe et al., *Biofactors.* 2009 Jan-feb; 35(1): 76-81).

Una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o la diana de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede inmovilizarse para facilitar la separación de formas complejas de formas no complejas de una o ambas proteínas. La unión de un compuesto de prueba a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una variante de la misma, o interacción de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 con una molécula objetivo en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, se puede lograr en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz (por ejemplo, proteínas de fusión glutatión-S-transferasa (GST) o proteínas de fusión glutatión-S-transferasa puede adsorberse en perlas de glutatión y Sepharose (Sigma Chemical; St. Louis, Mo) o en placas de microtitulación derivadas de glutatión).

Una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o una variante de la misma, también puede inmovilizarse uniéndose a un soporte sólido. Ejemplos no limitantes de soportes sólidos adecuados incluyen portaobjetos de vidrio o plástico, placas de cultivo de tejidos, pozos de microtitulación, tubos, chips de silicio o partículas tales como perlas (que incluyen, entre

otras, látex, poliestireno o perlas de vidrio). Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para unir un polipéptido (o polinucleótido) correspondiente a Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o una variante del mismo, o compuesto de prueba a un soporte sólido, incluido el uso de enlaces covalentes y no covalentes, o absorción pasiva.

5 La expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 también se puede controlar. Por ejemplo, los reguladores de la expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden identificarse mediante el contacto de una célula con un compuesto de prueba y la determinación de la expresión de una proteína codificada por Jak 1, Jak 2, Stat 1 o
10 gen Stat 2 o secuencias de ácido nucleico de ARNm Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula. El nivel de expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o secuencias de ácido nucleico de ARNm Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula en presencia del compuesto de prueba se compara con el nivel de expresión de proteína o ARNm en ausencia del compuesto de prueba. El compuesto de prueba se puede identificar como un regulador de la expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 con base en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o las secuencias de ácido nucleico de ARNm Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula es estadísticamente o significativamente mayor en presencia del
15 compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un estimulador/potenciador de la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 secuencias de ácido nucleico de ARNm en la célula. Se puede decir que el compuesto de prueba es un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 (como un agonista).

20 Alternativamente, cuando la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o las secuencias de ácido nucleico de ARNm Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula es estadísticamente o significativamente menor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto se identifica como un inhibidor de la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 secuencias de ácido nucleico de ARNm en la célula. También se puede decir que el compuesto de prueba es un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 (como un antagonista). El nivel de expresión de una proteína
25 codificada por un gen de ARNm de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o secuencias de ácido nucleico de ARNm de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la célula en las células puede determinarse mediante métodos descritos previamente.

30 Para los ensayos de unión, el compuesto de prueba puede ser una molécula pequeña que se une y ocupa el sitio de unión de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o una variante del mismo. Esto puede hacer que el sitio de unión del ligando sea inaccesible para el sustrato de manera que se evite la actividad biológica normal. Ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos. En los ensayos de unión, el compuesto de prueba o un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede comprender un marcador detectable, como un marcador fluorescente, radioisotópico,
35 quimioluminiscente o enzimático (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante o luciferasa). La detección de un compuesto de prueba que se une a un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se puede determinar mediante recuento directo de radioemisión, recuento de centelleo o determinando la conversión de un sustrato apropiado a un producto detectable.

40 La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para unirse a una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 también se puede lograr usando el Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real [McConnell et al., 1992, Science 257 1906-1912; Sjolander, Urbaniczky, 1991, Anal. Chem 63, 2338-2345]. BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar a ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIA-core™). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia del plasmón superficial (SPR) se pueden usar como una
45 indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y modulan su actividad, un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser utilizado como proteína cebo en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos (Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705; Patente de los Estados Unidos No. 5,283,317), según los métodos practicados en el arte. El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de unión y activación de ADN separables.

55 Ensayos funcionales. Los compuestos de prueba pueden analizarse para determinar la capacidad de aumentar o disminuir la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o una variante de la misma. La actividad se puede medir después de poner en contacto una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 purificada, una preparación de membrana celular o una célula intacta con un compuesto de prueba. Un compuesto de prueba que disminuye la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos
60 aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o 100% se identifica como un agente potencial para disminuir la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, por ejemplo un antagonista. Un compuesto de prueba que aumenta la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos
65 aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos

aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o 100% se identifica como un agente potencial para aumentar la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, por ejemplo un agonista.

Tratamiento y Prevención

5

La divulgación también se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto. En una realización, el método comprende detectar la presencia de una alteración en un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en una muestra del sujeto, siendo la presencia de la alteración indicativa de un trastorno de pérdida de cabello, o la predisposición a un trastorno de pérdida de cabello y, administrando al sujeto que lo necesita, un tratamiento terapéutico contra un trastorno de pérdida de cabello. El tratamiento terapéutico puede ser una administración de fármacos (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNsi dirigido a un ácido nucleico Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2). En una realización, la molécula terapéutica a administrar comprende un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, que comprende al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o 100% de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7, y exhibe la función de disminuir la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Esto puede restaurar la capacidad de iniciar el crecimiento del cabello en las células derivadas de los folículos pilosos o la piel. En otra realización, la molécula terapéutica a administrar comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que codifica un polipéptido, que comprende al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o 100% de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8, y codifica un polipéptido con la función de disminuir la expresión de una proteína codificada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, restaurando así la capacidad de iniciar el crecimiento del cabello en las células derivado de las células del folículo piloso o de la piel.

La alteración se puede determinar a nivel del ADN, ARN o polipéptido. Opcionalmente, la detección se puede determinar realizando un ensayo de ligadura de oligonucleótidos, un ensayo basado en confirmación, un ensayo de hibridación, un ensayo de secuenciación, un ensayo de amplificación específica de alelo, un ensayo de microsecuenciación, un análisis de curva de fusión, una cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC) ensayo (por ejemplo, véase Jones et al, (2000) Hum Genet., 106(6): 663-8), o una combinación de los mismos. En otra realización, la detección se realiza secuenciando todo o parte de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o mediante hibridación selectiva o amplificación de todo o parte de un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 gene. Se puede llevar a cabo una amplificación específica del gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 antes del paso de identificación de alteración.

Una alteración en una región cromosómica ocupada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser cualquier forma de mutación(es), eliminación(es), reordenamiento(s) y/o inserciones en la codificación y/o región no codificante del locus, solo o en varias combinaciones. Las mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales. Las inserciones pueden abarcar la adición de uno o varios residuos en una porción codificante o no codificante del locus del gen. Las inserciones pueden comprender una adición de entre 1 y 50 pares de bases en el locus del gen. Las eliminaciones pueden abarcar cualquier región de uno, dos o más residuos en una porción codificante o no codificante del locus del gen, tal como desde dos residuos hasta el gen o locus completo. Las eliminaciones pueden afectar a regiones más pequeñas, como dominios (intrones) o secuencias repetidas o fragmentos de menos de aproximadamente 50 pares de bases consecutivas, aunque también pueden ocurrir eliminaciones más grandes. La reorganización incluye la inversión de secuencias. La alteración en una región cromosómica ocupada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede dar como resultado sustituciones de aminoácidos, empalme o procesamiento de ARN, inestabilidad del producto, la creación de codones de detención, mutaciones de cambio de marco y/o producción de polipéptidos truncados. La alteración puede dar como resultado la producción de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 con función, estabilidad, focalización o estructura alteradas. La alteración también puede causar una reducción, o incluso un aumento en la expresión de proteínas. En una realización, la alteración en la región cromosómica ocupada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede comprender una mutación puntual, una eliminación o una inserción en un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 gen o producto de expresión correspondiente. En otra realización, la alteración puede ser una eliminación o eliminación parcial de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. La alteración se puede determinar a nivel del ADN, ARN o polipéptido.

En otra realización, el método puede comprender detectar la presencia de expresión de ARN alterada. La expresión de ARN alterado incluye la presencia de una secuencia de ARN alterada, la presencia de un empalme o procesamiento de ARN alterado, o la presencia de una cantidad alterada de ARN. Estos pueden detectarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, incluida la secuenciación de todo o parte del ARN o mediante hibridación selectiva o amplificación selectiva de todo o parte del ARN. En una realización adicional, el método puede comprender detectar la presencia de expresión alterada de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. La expresión de polipéptido alterado incluye la presencia de una secuencia de polipéptido alterada, la presencia de una cantidad alterada de polipéptido o la presencia de una distribución de tejido alterada. Estos pueden detectarse mediante

diversas técnicas conocidas en la técnica, incluida la secuenciación y/o la unión a ligandos específicos (tales como anticuerpos).

Se pueden usar diversas técnicas conocidas en el arte para detectar o cuantificar la expresión alterada de genes o ARN o secuencias de ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, hibridación, secuenciación, amplificación y/o unión a ligandos específicos (tales como anticuerpos). Otros métodos adecuados incluyen oligonucleótidos específicos de alelos (ASO), ligadura de oligonucleótidos, amplificación específica de alelos, inmunotransferencia Southern (para ADN), inmunotransferencia Northern (para ARN), análisis de conformación monocatenario (SSCA), PFGE, hibridación fluorescente in situ (FISH), migración de gel, electroforesis en gel desnaturizante sujeta, HLPC desnaturizante, análisis de curva de fusión, análisis de heterodúplex, protección contra RNasa, escisión química o enzimática, ELISA, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA). Algunas de estas metodologías (como SSCA y CGGE) se basan en un cambio en la movilidad electroforética de los ácidos nucleicos, como resultado de la presencia de una secuencia alterada. Según estas técnicas, la secuencia alterada se visualiza mediante un cambio en la movilidad de los geles. Los fragmentos se pueden secuenciar para confirmar la alteración. Algunas otras metodologías se basan en la hibridación específica entre ácidos nucleicos del sujeto y una sonda específica para ARN o gen alterado o de tipo salvaje. La sonda puede estar en suspensión o inmovilizada en un sustrato. La sonda se puede etiquetar para facilitar la detección de híbridos. Algunas de estas metodologías son adecuadas para evaluar una secuencia de polipéptidos o un nivel de expresión, como inmunotransferencia Northern, ELISA y RIA. Estos últimos requieren el uso de un ligando específico para el polipéptido, por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico.

Secuenciación. La secuenciación puede llevarse a cabo utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, utilizando secuenciadores automáticos. La secuenciación puede realizarse en el gen completo Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o en dominios específicos del mismo, como aquellos de los que se sabe o se sospecha que portan mutaciones perjudiciales u otras alteraciones.

Amplificación. La amplificación se basa en la formación de híbridos específicos entre secuencias complementarias de ácido nucleico que sirven para iniciar la reproducción de ácidos nucleicos. La amplificación puede realizarse de acuerdo con diversas técnicas conocidas en la técnica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Estas técnicas se pueden realizar utilizando reactivos y protocolos disponibles comercialmente. Las técnicas útiles en la técnica abarcan PCR en tiempo real, PCR específica de alelo o PCR-SSCP. La amplificación generalmente requiere el uso de cebadores de ácido nucleico específicos para iniciar la reacción. Los cebadores de ácidos nucleicos útiles para amplificar secuencias de un locus o gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden hibridarse específicamente con una porción de un locus de genes Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que flanquean un objetivo región del locus, en donde la región objetivo se altera en ciertos sujetos que tienen un trastorno de pérdida de cabello. En una realización, la amplificación puede comprender el uso de cebadores de PCR directos e inversos que comprenden secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO. 2, 4, 6 u 8.

La divulgación proporciona un cebador de ácidos nucleicos, en el que el cebador puede ser complementario e hibridarse específicamente con una porción de una secuencia codificante de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 (por ejemplo, gen o ARN) alterada en ciertos sujetos que tienen un trastorno de pérdida de cabello. Los cebadores pueden ser específicos para secuencias alteradas en un gen o ARN Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Al usar tales cebadores, la detección de un producto de amplificación indica la presencia de una alteración en un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o la ausencia de dicho gen. Los cebadores también se pueden usar para identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) ubicados en o alrededor de un locus genético Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2; Los SNP pueden comprender un solo cambio de nucleótidos, o un grupo de SNP en y alrededor de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Ejemplos de cebadores pueden ser moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios de aproximadamente 5 a 60 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 8 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. La secuencia puede derivarse directamente de la secuencia de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. La complementariedad perfecta es útil para garantizar una alta especificidad; sin embargo, se puede tolerar cierto desajuste. Por ejemplo, un cebador de ácidos nucleicos o un par de cebadores de ácidos nucleicos como se describió anteriormente pueden usarse en un método para detectar la presencia o una predisposición a un trastorno de pérdida de cabello en un sujeto.

Los métodos de amplificación incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y., 1990 y PCR STRATEGIES, 1995, ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, Genomics 4: 560, 1989; Landegren, Science 241: 1077, 1988; Barringer, Gene 89: 117, 1990); amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwok, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173, 1989), y, replicación de secuencia autosostenida (véase, por ejemplo, Guatelli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874, 1990); amplificación de Q Beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith, J. Clin. Microbiol. 35: 1477-1491, 1997), ensayo de amplificación Q-beta replicasa automatizado (véase, por ejemplo, Burg, Mol. Cell. Probes 10: 257-271, 1996) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger, Methods Enzymol. 152: 307-316, 1987; Sambrook; Ausubel; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195 y 4,683,202; Sooknanan, Biotechnology 13: 563-564, 1995.

Hibridación selectiva. Los métodos de detección de hibridación se basan en la formación de híbridos específicos entre secuencias de ácido nucleico complementarias que sirven para detectar alteraciones de secuencia de ácidos nucleicos. Una técnica de detección implica el uso de una sonda de ácido nucleico específica para genes o ARN alterados o de tipo salvaje, seguida de la detección de la presencia de un híbrido. La sonda puede estar en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato o soporte (por ejemplo, como en una matriz de ácido nucleico o tecnologías de chips). La sonda se puede etiquetar para facilitar la detección de híbridos. Por ejemplo, una muestra del sujeto puede ponerse en contacto con una sonda de ácidos nucleicos específica para un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 de tipo salvaje o un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 alterado, y la formación de un híbrido se puede evaluar posteriormente. En una realización, el método comprende poner en contacto simultáneamente la muestra con un conjunto de sondas que son específicas, respectivamente, para un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 de tipo salvaje y para diversas formas alteradas de los mismos. Por lo tanto, es posible detectar directamente la presencia de diversas formas de alteraciones en un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 en la muestra. Además, diversas muestras de diversos sujetos pueden tratarse en paralelo.

Una sonda puede ser una secuencia de polinucleótidos que es complementaria y puede hibridarse específicamente con un (porción objetivo de) un gen o ARN Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, y que es adecuada para detectar polimorfismos de polinucleótidos asociados con alelos de un gen (o genes) Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que predisponen o están asociados con un trastorno de pérdida de cabello. Las sondas útiles son aquellas que son complementarias de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, ARN o porción objetivo del mismo. Las sondas pueden comprender ácidos nucleicos monocatenarios de entre 8 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 10 y 800, entre 15 y 700, o entre 20 y 500. También se pueden usar sondas más largas. Una sonda útil es una molécula de ácido nucleico monocatenario de entre 8 y 500 nucleótidos de longitud, que puede hibridarse específicamente con una región de un gen o ARN Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 que conlleva una alteración. Por ejemplo, la sonda se puede dirigir a una región cromosómica ocupada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2.

La secuencia de las sondas puede derivarse de las secuencias de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y ARN como se proporciona en este documento. Se pueden realizar sustituciones de nucleótidos, así como modificaciones químicas de la sonda. Dichas modificaciones químicas pueden lograrse para aumentar la estabilidad de los híbridos (por ejemplo, grupos intercalados) o para marcar la sonda. Algunos ejemplos de marcadores incluyen, sin limitación, radiactividad, fluorescencia, luminiscencia y marcado enzimático.

Se encuentra una guía para la hibridación de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Sambrook, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997; *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., 1993.

Unión específica de ligando

Como se discute aquí, la alteración en una región cromosómica ocupada por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 o la alteración en la expresión de un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, también se puede detectar seleccionando las alteraciones en una secuencia o nivel de expresión de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. Se pueden usar diferentes tipos de ligandos, como anticuerpos específicos. En una realización, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo específico para un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y posteriormente se determina la formación de un complejo inmune. Se pueden usar varios métodos para detectar un complejo inmune, tales como ELISA, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA).

Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, así como fragmentos o derivados del mismo que tienen sustancialmente la misma especificidad de antígeno. Los fragmentos incluyen regiones Fab, Fab'2 o CDR. Los derivados incluyen anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos humanizados o anticuerpos polifuncionales. Un anticuerpo específico para un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede ser un anticuerpo que se une selectivamente a dicho polipéptido, es decir, un anticuerpo generado contra un polipéptido codificado por un Jak 1, Jak 2, Stat 1 o gen Stat 2 o un fragmento que contiene epítipo del mismo. Aunque puede ocurrir una unión no específica a otros antígenos, la unión al polipéptido diana ocurre con una mayor afinidad y puede discriminarse de manera confiable de la unión no específica. En una realización, el método puede comprender poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo específico para un tipo salvaje o una forma alterada de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, y determinar la presencia de un complejo inmune. Opcionalmente, la muestra puede ponerse en contacto con un soporte recubierto con anticuerpo específico para el tipo salvaje o la forma alterada de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2. En una realización, la muestra puede ponerse en contacto simultáneamente, o en paralelo o secuencialmente, con varios anticuerpos específicos para diferentes formas de un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, como un tipo salvaje y diversas formas alteradas de los mismos.

Terapia génica y métodos de reemplazo de proteínas

El suministro de ácidos nucleicos en células viables puede realizarse ex vivo, in situ o in vivo mediante el uso de vectores, tales como vectores virales (por ejemplo, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado o un retrovirus), o ex

vivo mediante el uso de métodos físicos de transferencia de ADN (por ejemplo, liposomas o tratamientos químicos). Las técnicas no limitantes adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamíferos in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano y el método de precipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Anderson, *Nature*, suplemento al vol. 392, no. 6679, pp. 25-20 (1998)). La introducción de un ácido nucleico o un gen que codifica un polipéptido descrito en el presente documento también se puede lograr con sustratos extracromosómicos (expresión transitoria) o cromosomas artificiales (expresión estable). Las células también se pueden cultivar ex vivo en presencia de composiciones terapéuticas de la presente invención para proliferar o producir un efecto o actividad deseados en dichas células. Las células tratadas pueden entonces introducirse in vivo con fines terapéuticos.

Los ácidos nucleicos pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Se han utilizado varios virus como vectores de transferencia génica, incluidos papovavirus, por ejemplo, SV40 (Madzak et al., 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner et al., 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Wilkinson et al., 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1990), virus vaccinia (Moss, 1992), virus adenoasociado (Muzyczka, 1992; Ohi et al., 1990), virus del herpes que incluyen HSV y EBV (Margolskee, 1992; Johnson et al., 1992; Fink et al., 1992; Breakfield and Geller, 1987; Freese et al., 1990) y retrovirus de aves (Biandypadhyay and Temin, 1984; Petropoulos et al., 1992), murino (Miller, 1992; Miller et al., 1985; Sorge et al., 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller et al., 1988) y origen humano (Shimada et al., 1991; Helseth et al., 1990; Page et al., 1990; Buchschacher and Panganiban, 1992). Ejemplos no limitantes de técnicas de transferencia génica in vivo incluyen la transfección con vectores virales (por ejemplo, Retrovirales) (véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,252,479) y la transfección mediada por liposomas proteicos virales (Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11: 205-210 (1993)). Por ejemplo, las vacunas de ADN desnudo son generalmente conocidas en la técnica; véase Brower, *Nature Biotechnology*, 16: 1304-1305 (1998). Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,328,470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen, et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). La preparación del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está incrustado el vehículo de administración génica. Alternativamente, donde el vector de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

Para revisiones de protocolos y métodos de terapia génica, véase Anderson et al., *Science* 256: 808-813 (1992); Patentes Nos. 5,252,479, 5,747,469, 6,017,524, 6,143,290, 6,410,010 6,511,847; y las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2002/0077313 y 2002/00069. Para revisiones adicionales de la tecnología de terapia génica, véase Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281 (1989); Verma, *Scientific American*: 68-84 (1990); Miller, *Nature*, 357: 455-460 (1992); Kikuchi et al., *J Dermatol Sci.* 2008 May; 50(2): 87-98; Isaka et al., *Expert Opin Drug Deliv.* 2007 Sep; 4(5): 561-71; Jager et al., *Curr Gene Ther.* 2007 Aug; 7(4): 272-83; Waehler et al., *Nat Rev Genet.* 2007 Aug; 8(8): 573-87; Jensen et al., *Ann Med.* 2007; 39 (2): 108-15; Herweijer et al., *Gene Ther.* 2007 Jan ; 14(2): 99-107; Eliyahu et al., *Molecules*, 2005Jan 31; 10(1): 34-64; y Altaras et al., *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005; 99: 193-260.

La terapia de reemplazo de proteínas puede aumentar la cantidad de proteína mediante la introducción exógena de proteínas de tipo salvaje o biológicamente funcionales por medio de infusión. Se puede sintetizar un polipéptido de reemplazo de acuerdo con técnicas químicas conocidas o se puede producir y purificar mediante técnicas biológicas moleculares conocidas. La terapia de reemplazo de proteínas se ha desarrollado para diversos trastornos. Por ejemplo, una proteína de tipo salvaje se puede purificar a partir de un sistema de expresión celular recombinante (por ejemplo, células de mamífero o células de insecto; véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,580,757 de Desnick et al.; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,395,884 y 6,458,574 de Selden et al., Patente de los Estados Unidos No. 6,461,609 de Calhoun et al.; Patente de los Estados Unidos No. 6,210,666 de Miyamura et al.; Patente de los Estados Unidos No. 6,083,725 de Selden et al.; Patente de los Estados Unidos No. 6,451,600 de Rasmussen et al.; Patente de los Estados Unidos No. 5,236,838 de Rasmussen et al. y Patente de los Estados Unidos No. 5,879,680 de Ginns et al.), Placenta humana o leche animal (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,188,045 de Reuser et al.), u otras fuentes conocidas en el arte. Después de la infusión, la proteína exógena puede ser absorbida por los tejidos a través de un mecanismo no específico o mediado por el receptor.

Un polipéptido codificado por un gen Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 también puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, supra; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (Véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy et al., *Science* 228: 190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25: 351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71: 105 (1989)). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of*

Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115). -138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada son analizados en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

Composiciones farmacéuticas y administración para terapia

Las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden administrarse al sujeto una vez (por ejemplo, como una inyección o deposición única). Alternativamente, las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 se pueden administrar una o dos veces al día a un sujeto que lo necesite durante un período de aproximadamente dos a aproximadamente veintiocho días, o de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. Las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 también se pueden administrar una o dos veces al día a un sujeto durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 veces al año, o una combinación de los mismos. Además, las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 de la invención pueden administrarse conjuntamente con otro agente terapéutico. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, la cantidad efectiva de las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 administrados al sujeto pueden comprender la cantidad total de gen producto administrado en todo el régimen de dosificación.

Las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden administrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado para administrar proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 para células del sujeto, tales como la dermis, epidermis, células de la papila dérmica o células del folículo piloso. Por ejemplo, las proteínas Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 y los compuestos moduladores Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 pueden administrarse mediante métodos adecuados para transfectar células. Los métodos de transfección para células eucariotas son bien conocidos en la técnica e incluyen la inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia de liposomas o transferencia mediada por materiales lipofílicos; administración de ácido nucleico mediada por receptor, aceleración biobalística o de partículas; precipitación de fosfato de calcio y transfección mediada por vectores virales.

Las composiciones de esta invención pueden formularse y administrarse para reducir los síntomas asociados con un trastorno de pérdida de cabello por cualquier medio que produzca contacto del ingrediente activo con el sitio de acción del agente en el cuerpo de un sujeto, tal como un humano o animal (por ejemplo, un perro, gato o caballo). Se pueden administrar por cualquier medio convencional disponible para su uso junto con productos farmacéuticos, ya sea como ingredientes activos terapéuticos individuales o en una combinación de ingredientes activos terapéuticos. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administran con un vehículo farmacéutico seleccionado en función de la ruta de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

Una dosis terapéuticamente eficaz de los compuestos moduladores de Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 puede depender de una serie de factores conocidos por los expertos en la materia. La(s) dosis(es) de los compuestos moduladores de Jak 1 o Jak 2 pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la identidad, el tamaño y la condición del sujeto o muestra que se está tratando, más dependiendo de la ruta por la cual se administrará la composición, si corresponde, y el efecto que el profesional desea que los compuestos moduladores de Jak 1 o Jak 2 tengan sobre el ácido nucleico o polipéptido descrito en este documento. Estas cantidades pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la materia. Cualquiera de las aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento puede aplicarse a cualquier sujeto que necesite dicha terapia, incluyendo, por ejemplo, un mamífero como un perro, un gato, una vaca, un caballo, un conejo, un mono, un cerdo, una oveja, una cabra o un humano.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse para una variedad de vías de administración, incluida la administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa (20th Ed., 2000). Para la administración sistémica, es útil una inyección, que incluye intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección, las composiciones terapéuticas de la invención pueden formularse en soluciones líquidas, por ejemplo, en reguladores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank o la solución de Ringer. Además, las composiciones terapéuticas pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan por ser al menos estériles y libres de pirógenos. Estas formulaciones farmacéuticas incluyen formulaciones para uso humano y veterinario.

Según la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Se puede usar cualquier medio o agente convencional que sea compatible con el compuesto activo. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La divulgación también se refiere a un kit que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto modulador Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2 identificado usando los ensayos de cribado descritos en este documento empaquetados con instrucciones de uso. Para los moduladores que son antagonistas de la actividad de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, o que reducen la expresión de una proteína Jak 1, Jak 2, Stat 1 o Stat 2, las instrucciones especificarían el uso de composición farmacéutica para promover la pérdida de cabello en la superficie del cuerpo de un mamífero (por ejemplo, brazos, piernas, área del bikini, cara).

Para los compuestos moduladores de Jak 1 o Jak 2 que son agonistas de la actividad de una proteína Jak 1 o Jak 2 o aumentan la expresión de una o más proteínas codificadas por los genes Jak 1 o Jak 2, las instrucciones especificarían el uso de la composición farmacéutica para regular el crecimiento del cabello. En una realización, las instrucciones especificarían el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos de pérdida de cabello. En una realización adicional, las instrucciones especificarían el uso de la composición farmacéutica para restaurar la pigmentación del cabello. Por ejemplo, administrar un agonista puede reducir las canas en un sujeto.

Una composición farmacéutica que contiene un compuesto modulador Jak 1 o Jak 2 puede administrarse junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos discutidos aquí. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a polipéptidos codificados por genes que comprenden un gen Jak 1 o Jak 2, o variantes del mismo, o agonistas y antagonistas de un polipéptido codificado por un gen Jak 1 o Jak 2. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril que incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina regulada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solo, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto modulador Jak 1 o Jak 2 (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados aquí, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados aquí. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación útiles son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto modulador Jak 1 o Jak 2 puede aplicarse a través de sistemas de administración transdérmica, que liberan lentamente el compuesto activo para absorción percutánea. Pueden usarse potenciadores de permeación para facilitar la penetración transdérmica de los factores activos en los medios condicionados. Los parches transdérmicos están descritos, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos No. 5,407,713; Patente de los Estados Unidos No. 5,352,456; Patente de los Estados Unidos No. 5,332,213; Patente de los Estados Unidos No. 5,336,168; Patente de los Estados Unidos No. 5,290,561; Patente de los Estados Unidos No. 5,254,346; Patente de los Estados Unidos No. 5,164,189; Patente de los Estados Unidos No. 5,163,899; Patente de los Estados Unidos No. 5,088,977; Patente de los Estados Unidos No. 5,087,240; Patente de los Estados Unidos No. 5,008,110; y Patente de los Estados Unidos No. 4,921,475.

Se pueden utilizar diversas rutas de administración y diversos sitios de implantación celular, tales como subcutáneo o intramuscular, para introducir la población agregada de células en un sitio de preferencia. Una vez implantadas en un sujeto (como un ratón, una rata o un humano), las células agregadas pueden estimular la formación de un folículo piloso y el crecimiento posterior de una estructura capilar en el sitio de introducción. En otra realización, las células transfectadas (por ejemplo, las células que expresan una proteína codificada por un gen Jak 1 o Jak 2 se implantan en un sujeto para promover la formación de folículos pilosos dentro del sujeto. En otras realizaciones, las células transfectadas son células derivadas de el bulbo final de un folículo piloso (como las células de la papila dérmica o las células de la vaina dérmica). Células agregadas (por ejemplo, células cultivadas en un cultivo de gota colgante) o células transfectadas (por ejemplo, células producidas como se describe aquí) mantenidas durante 1 o se pueden introducir (o implantar) más pasajes en un sujeto (como una rata, un ratón, un perro, un gato, un humano y similares).

La administración "subcutánea" puede referirse a la administración justo debajo de la piel (es decir, debajo de la dermis). En general, el tejido subcutáneo es una capa de grasa y tejido conectivo que alberga vasos sanguíneos y nervios más grandes. El tamaño de esta capa varía en todo el cuerpo y de persona a persona. La interfaz entre las capas subcutánea y muscular se puede abarcar mediante administración subcutánea.

Este modo de administración puede ser factible cuando la capa subcutánea es suficientemente delgada para que los factores presentes en las composiciones puedan migrar o difundirse desde el lugar de administración y entrar en contacto con las células del folículo piloso responsables de la formación del cabello. Por lo tanto, donde se utiliza la administración intradérmica, el bolo de la composición administrada se localiza cerca de la capa subcutánea.

La administración de los agregados celulares (tales como los agregados DP o DS) no está restringida a una única ruta, sino que puede abarcar la administración por múltiples rutas. Por ejemplo, las administraciones ejemplares por múltiples rutas incluyen, entre otras, una combinación de administración intradérmica e intramuscular, o administración

intradérmica y subcutánea. Las administraciones múltiples pueden ser secuenciales o concurrentes. Otros modos de aplicación por múltiples rutas serán evidentes para el experto.

En otras realizaciones, este método de implantación será un tratamiento único para algunos sujetos. En realizaciones adicionales, se requerirán implantaciones de terapia celular múltiple. En algunas realizaciones, las células utilizadas para la implantación generalmente serán células genéticamente modificadas específicas del sujeto. En otra realización, se pueden usar células obtenidas de una especie diferente u otro individuo de la misma especie. Por lo tanto, el uso de tales células puede requerir la administración de un inmunosupresor para evitar el rechazo de las células implantadas. Dichos métodos también se han descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2004/0057937 y la Publicación de Solicitud PCT WO 2001/32840.

Inhibidores

Las citoquinas se producen para activar las células vecinas para comunicar señales de peligro entre sí y propagar y amplificar la respuesta inflamatoria. A lo largo de los años, se aprendió cómo neutralizar estas citoquinas con anticuerpos bloqueantes e inhibir su señalización en las células que responden mediante inhibidores de proteínas de tirosina quinasa de molécula pequeña. Existen fármacos aprobados por la FDA para ambas metodologías, por ejemplo, anticuerpos bloqueadores IL-2 y TNF y la molécula pequeña Gleevec™ disponible por vía oral que bloquea la señalización de las citoquinas. Siempre que sea posible, el centro buscará formulaciones tópicas de moléculas pequeñas que deberían mejorar la eficacia al tiempo que limitan la toxicidad sistémica (índices terapéuticos mejorados) fomentando la evaluación clínica en AA de otros inhibidores de moléculas pequeñas en flujo de desarrollo biofarmacéutico.

Para bloquear la señalización de los receptores de citoquinas, se puede usar el inhibidor tópico/oral de JAK1/2 (Incyte), que ya ha demostrado seguridad y eficacia en pacientes con psoriasis y AR.

Los inhibidores pueden comprender péptidos (como anticuerpos o fragmentos de los mismos), moléculas pequeñas, ácidos nucleicos (como ARNs o ARN antisentido) u otros agentes que pueden unirse a una molécula de polipéptido codificada por un gen de interés y/o moléculas que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de una proteína de interés o su expresión.

Tal como se usa en este documento, un "inhibidor de Jak 1" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen Jak 1 o una proteína o polipéptido Jak 1 e inhibe su actividad y/o su expresión. El compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por Jak 1.

En una realización, un inhibidor de Jak 1 puede ser un fragmento peptídico que se une a una proteína que comprende SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el fragmento puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos aminoácidos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre e incluyendo aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos de péptidos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse a través de métodos de síntesis en fase líquida o en fase sólida (Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Tal como se usa en este documento, un "inhibidor de Jak 2" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen Jak 2 o una proteína o polipéptido Jak 2 e inhibe su actividad y/o su expresión. El compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por Jak 2.

En una realización, un inhibidor de Jak 2 puede ser un fragmento peptídico que se une a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el fragmento puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos aminoácidos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre e incluyendo aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre

aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos de péptidos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse a través de métodos de síntesis en fase líquida o en fase sólida (Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor de Stat 1" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen de Stat 1 o una proteína o polipéptido de Stat 1 e inhibe su actividad y/o su expresión. El compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por Stat 1.

En una realización, un inhibidor de Stat 1 puede ser un fragmento de péptido que se une a una proteína que comprende la SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el fragmento puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 5. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos aminoácidos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre e incluyendo aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos de péptidos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse a través de métodos de síntesis en fase líquida o en fase sólida (Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor de Stat 2" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen Stat 2 o una proteína o polipéptido Stat 2 e inhibe su actividad y/o su expresión. El compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por Stat 2.

En una realización, un inhibidor de Stat 2 puede ser un fragmento peptídico que se une a una proteína que comprende SEQ ID NO: 7. Por ejemplo, el fragmento puede abarcar cualquier porción de al menos aproximadamente 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 7. El fragmento puede comprender al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, al menos aproximadamente 60 aminoácidos consecutivos aminoácidos, o al menos aproximadamente 75 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 7. Los fragmentos incluyen todas las longitudes de aminoácidos posibles entre e incluyendo aproximadamente 8 y aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, longitudes entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 100 aminoácidos, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 aminoácidos, o entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 aminoácidos. Estos fragmentos de péptidos pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse a través de métodos de síntesis en fase líquida o en fase sólida (Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra).

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor de Jak/Stat" se refiere a un compuesto que interactúa con un gen Jak1/Jak2/Stat1/Stat2 o una proteína o polipéptido Jak1/Jak2/Stat1/Stat2 e inhibe su actividad y/o su expresión. El compuesto puede disminuir la actividad o expresión de una proteína codificada por Jak1/Jak2/Stat1/Stat2.

Un inhibidor puede ser una proteína, tal como un anticuerpo (monoclonal, policlonal, humanizado, quimérico o completamente humano), o un fragmento de unión del mismo, dirigido contra un polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. Un fragmento de anticuerpo puede ser una forma de un anticuerpo diferente a la forma de longitud completa e incluye porciones o componentes que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, además de los fragmentos de anticuerpos que han sido diseñados. Los fragmentos de anticuerpos pueden incluir, entre otros, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, Fv y (Fab')₂, triacuerpos, Fc, Fab, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, regiones marco, regiones constantes y similares (véase, Maynard et al., (2000) Ann. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76; Hudson (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395-402). Los anticuerpos pueden obtenerse comercialmente, generarse a medida o sintetizarse contra un antígeno de interés de acuerdo con los métodos establecidos en la técnica (Janeway et al., (2001) Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing).

Un inhibidor también puede ser una molécula pequeña que se une a una proteína y altera su función. Las moléculas pequeñas son un grupo diverso de sustancias sintéticas y naturales que generalmente tienen pesos moleculares bajos. Se pueden aislar de fuentes naturales (por ejemplo, plantas, hongos, microbios y similares), se obtienen comercialmente y/o están disponibles como bibliotecas o colecciones, o se sintetizan. Las moléculas pequeñas candidatas que modulan una proteína pueden identificarse mediante un cribado in silico o un cribado de alto rendimiento (HTP) de bibliotecas combinatorias. La mayoría de los productos farmacéuticos convencionales, como la aspirina, la penicilina y muchos quimioterapéuticos, son moléculas pequeñas, se pueden obtener comercialmente, se pueden sintetizar químicamente o se pueden obtener de bibliotecas aleatorias o combinatorias (Werner et al., (2006) Brief Funct. Genomic Proteómica 5(1): 32-6). En algunas realizaciones, el agente es una molécula pequeña que se une, interactúa o se asocia con una proteína o ARN diana. Una molécula tan pequeña puede ser una molécula orgánica que, cuando la diana es una diana intracelular, es capaz de penetrar la bicapa lipídica de una célula para interactuar con la diana. Las moléculas pequeñas incluyen, entre otras, toxinas, agentes quelantes, metales y compuestos metaloides. Las moléculas pequeñas se pueden unir o conjugar a un agente de direccionamiento para guiar específicamente la molécula pequeña a una célula particular.

Composiciones farmacéuticas y administración para terapia

Un inhibidor o agonista descrito en este documento puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración, por ejemplo, el inhibidor y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Se puede usar cualquier medio o agente convencional que sea compatible con el compuesto activo. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Cualquiera de las aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento se puede aplicar a cualquier sujeto que necesite dicha terapia, incluyendo, por ejemplo, un mamífero como un perro, un gato, una vaca, un caballo, un conejo, un mono, un cerdo, una oveja, una cabra o un humano.

Una composición farmacéutica puede administrarse junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos discutidos aquí. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a polipéptidos. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril que incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina regulada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solo, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Una composición farmacéutica está formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EM™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil utilización en jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, puede ser útil incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el inhibidor (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo o molécula pequeña) o agonista en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados aquí, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados aquí. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación útiles son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal, en donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y expectora o traga.

Se pueden incluir agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan agentes de penetración apropiados para la barrera que va a ser permeada en la formulación. Tales agentes de penetración son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. A continuación, se describen métodos y materiales ejemplares, aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí también se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar, utilizando no más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a las sustancias y procedimientos específicos descritos aquí. Tales equivalentes se consideran dentro del alcance de esta invención, y están cubiertos por las reivindicaciones que siguen.

Las publicaciones y referencias citadas en este documento no se admiten como técnica anterior.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos para facilitar una comprensión más completa de la invención. Los siguientes ejemplos ilustran los modos a manera de ejemplo de hacer y practicar la invención. Sin embargo, el alcance de la invención no se limita a realizaciones específicas descritas en estos ejemplos, que son solo para fines ilustrativos, ya que se pueden utilizar métodos alternativos para obtener resultados similares.

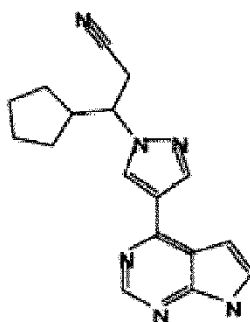
Ejemplo 1

Se ha demostrado que el interferón γ es un objetivo en AA murino (véase Nakamura, et al. 2008, Am J Pathol, 172(3): 650-658; véase también Freyschmidt-Paul et al., Br J Dermatol., 155(3): 515-521; véase también Gilhar et al., Journal Invest. Dermatol., 124 (1): 288-289). En la AA humana, los PBMC de AA muestran sesgo hacia Th1, la piel con AA muestra la firma IFN γ y los genes GWAS (SOCS/IFN- γ), pero también IL-2/6/13/21/26.

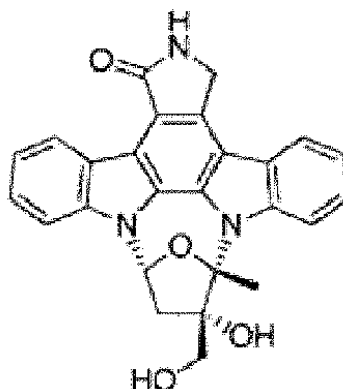
La ruta del interferón γ (Figura 7) induce NKG2DL en las células HF diana, mejora la presentación del antígeno por DC, promueve la autoinmunidad celular Th1 y aumenta la citólisis mediada por NK y CTL.

Los inhibidores de JAK1/2 en el desarrollo clínico incluyen a) INCB018424, tópico y oral; Actividad 5nM (Incyte); b) CEP-701 (Cephalon); y c) TG101348.

a)



b)



c)

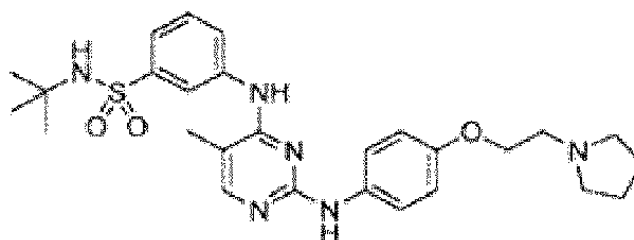


Tabla 1. INCB18424-203: Eventos adversos emergentes del tratamiento en orden descendente (todos los afectados) (la administración oral se considera un perfil aceptable)

Término preferido Medra	Vehículo (n=50)	Activo (n=149)
Irritación en el lugar de aplicación, prurito	7 (14.0)	14 (9.3)
Nasofaringitis	1 (2.0)	10 (6.7)
Infección del tracto respiratorio superior	3 (6.0)	10 (6.7)
Sinusitis	1 (2.0)	6 (4.0)
Dolor de espalda	0 (0.0)	5 (3.4)
Dolor de cabeza	0 (0.0)	4 (2.7)
Influenza	2 (4.0)	4 (2.7)
Dolor abdominal	0 (0.0)	3 (2.0)
Seis SAE, ninguno relacionado con el tratamiento: próstata ca, hospitalización prolongada por colecistitis, coleditiasis (1.5%); reparación de hernia de disco, oclusión coronaria con hx ASHD (0.5%). CVA (vehículo)		

Los programas clínicos en AA incluyen lo siguiente:

- AA leve a moderada: Psoriasis de fase 2/3 y mielofibrosis de fase 3 oral, utilizando un inhibidor tópico JAK

Una cohorte basada en la población evaluó casos determinados a través del National Alopecia Areata Registry frente a controles determinados a través del proyecto de New York City Cancer. Fueron emparejados para la ascendencia del norte de Europa usando AIMS.

- 5 • Casos: n=1080 (Alopecia Universalis=482; Alopecia Totali =120; Alopecia Areata Transitoria=176; Alopecia Areata Parcheada=302)

• Controles: n=1053

- 10 La Figura 9 presenta un estudio de la Genomewide Association (GWAS) en alopecia areata.

Tabla 2: Lista de genes implicados en AA

Región	Gen	Función	Asociación más fuerte (valor p)	Relación de probabilidad máxima
2q33.2	CTLA4	Proliferación de células T	3.55×10^{-13}	1.44
	ICOS	Proliferación de células T	4.33×10^{-08}	1.32
4q27	IL21/IL2	Proliferación de células T-, B- y NK	4.27×10^{-08}	1.34
6q25.1	ULBP6	Ligando activador de NKG2D	4.49×10^{-19}	1.65
	ULBP3	Ligando activador de NKG2D	4.43×10^{-17}	1.52
9q31.1	STX17	Encanecimiento prematuro	3.60×10^{-07}	1.33
10p15.1	IL2RA (CD25)	Proliferación de células T	1.74×10^{-12}	1.41
11q13	PRDX5	Enzimas antioxidantes	4.14×10^{-07}	1.33
12q13	Eos (IKZF4)	Proliferación de células T	3.21×10^{-08}	1.34
	ERBB3	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	1.27×10^{-07}	1.34
6p21.32 (HLA)	MICA	Ligando activador de NKG2D	1.19×10^{-17}	1.44
	NOTCH4	Diferenciación de células T	1.03×10^{-08}	1.61
	BTNL2	Proliferación de células T	2.11×10^{-26}	2.70
	HLA-DRA	Presentación de antígeno	2.93×10^{-31}	2.62
	HLA-DQA1	Presentación de antígeno	3.60×10^{-17}	2.15
	HLA-DQA2	Presentación de antígeno	1.38×10^{-35}	5.43
	HLA-DQB2	Presentación de antígeno	1.73×10^{-13}	1.60
	HLA-DOB	Presentación de antígeno	2.07×10^{-08}	1.72

Tabla 3: Modelo de causa común de enfermedades autoinmunes de la piel. Véase también <http://www.genome.gov/gwastudies> (para psoriasis) y Jin et al., 2010, NEJM, 362: 1686-1697.

Región	Gen	Asociación más fuerte (valor p)	Relación de probabilidad máxima	Involucrado en otras enfermedades autoinmunes
2q33.2	CTLA4	3.55×10^{-13}	1.44	T1D, RA, CeD, MS, SLE, GD
	ICOS	4.33×10^{-08}	1.32	T1D, RA, CeD, MS, SLE, GD
4q27	IL21/IL2	4.27×10^{-08}	1.34	● T1D, RA, CeD, PS
6q25.1	ULBP6	4.49×10^{-19}	1.65	Ninguno
	ULBP3	4.43×10^{-17}	1.52	Ninguno

(continuación)

Región	Gen	Asociación más fuerte (valor p)	Relación de probabilidad máxima		Involucrado en otras enfermedades autoinmunes
9q31.1	STX17	360×10^{-07}	1.33		Ninguno
10p15.1	IL2RA (CD25)	1.74×10^{-12}	1.41	●	T1D, MS, GD, GV
11q13	PRDX5	4.14×10^{-07}	1.33		MS
12q13	Eos (IKZF4)	3.21×10^{-08}	1.34		T1D, SLE
	ERBB3	1.27×10^{-07}	1.34		T1D, SLE
6p21.32 (HLA)	MICA	1.19×10^{-07}	1.44	●	T1D, RA, CeD, UC, PS, SLE
	NOTCH4	1.03×10^{-08}	1.61		T1D, RA, MS
	C6orf10	1.45×10^{-16}	2.36	●●	T1D, RA, PS, GV
	BTNL2	2.11×10^{-26}	2.70	●	T1D, RA, UC, CD, SLE, MS, GV
	HLA-DRA	2.93×10^{-31}	2.62	●	T1D, RA, CeD, MS, GV
	HLA-DQA1	3.60×10^{-17}	2.15	●●	T1D, RA, CeD, MS, SLE, PS, CD, UC, GD, GV
	HLA-DQA2	1.38×10^{-35}	5.43		T1D, RA
	HLA-DQB2	1.73×10^{-13}	1.60		RA
	HLA-DOB	2.07×10^{-08}	1.72		

Diabetes tipo I (T1D), artritis reumatoide (AR), enfermedad celíaca (CeD), esclerosis múltiple (MS), sistema de lupus eritematoso (SLE), enfermedad de Graves (GD), psoriasis (PS), vitiligo generalizado (GV).

Región	Gen	Asociación más fuerte (valor p)	Relación de probabilidad máxima	Involucrado en otras enfermedades autoinmunes
2q33.2	CTLA4	3.55×10^{-13}	1.44	T1D, RA, CeD, MS, SLE, GD
	ICOS	4.33×10^{-08}	1.32	T1D, RA, CeD, MS, SLE, GD
4q27	IL21/IL2	4.27×10^{-08}	1.34	T1D, RA, CeD, MS
6q25.1	ULBP6	4.49×10^{-19}	1.65	ninguno
	ULBP3	4.43×10^{-17}	1.52	ninguno
9q31.1	STX17	3.60×10^{-07}	1.33	ninguno
10p15.1	IL2RA (CD25)	1.74×10^{-12}	1.41	T1D, MS, GD, GV
11q13	PRDX5	4.14×10^{-07}	1.33	MS
12q13	Eos (IKZF4)	3.21×10^{-08}	1.34	T1D, SLE
	ERBB3	1.27×10^{-07}	1.34	T1D, SLE
6p21.32 (HLA)	MICA	1.19×10^{-07}	1.44	T1D, RA, CeD, UC, PS, SLE
	NOTCH4	1.03×10^{-08}	1.61	T1D, RA, MS
	C6orf10	1.45×10^{-16}	2.36	T1D, RA, PS, GV
	BTNL2	2.11×10^{-26}	2.70	T1D, RA, UC, CD, SLE, MS, GV
	HLA-DRA	2.93×10^{-31}	2.62	T1D, RA, CeD, MS, GV
	HLA-DQA1	3.60×10^{-17}	2.15	T1D, RA, CeD, MS, SLE, PS, CD, UC, GD, GV
	HLA-DQA2	1.38×10^{-35}	5.43	T1D, RA
	HLA-DQB2	1.73×10^{-13}	1.60	RA
	HLA-DOB	2.07×10^{-08}	1.72	

Diabetes tipo I (T1D), artritis reumatoide (AR), enfermedad celíaca (CeD), esclerosis múltiple (MS), sistema de lupus eritematoso (SLE), enfermedad de Graves (GD), psoriasis (PS), vitiligo generalizado (GV).

Tabla 4: Modelo de causa común de enfermedades autoinmunes de la piel. Véase también <http://www.genome.gov/gwastudies> (para psoriasis) y Jin et al., 2010, NEJM, 362: 1686-1697.

5 Tabla 5: Lista de genes implicados en AA. Los círculos negros indican genes que afectan a NKG2D; los círculos grises indican genes que afectan la regulación de las células T; los círculos negros con estrella indican genes que afectan los órganos terminales

Región	Gen	Función	Asociación más fuerte (valor p)	Relación de probabilidad máxima
2q33.2 	CTLA4	Proliferación de células T	3.55×10^{-13}	1.44
	ICOS	Proliferación de células T	4.33×10^{-08}	1.32
4q27 	IL21/IL2	Proliferación de células T, banda NK	4.27×10^{-08}	1.34
6q25.1 	ULBP6	Ligando activador de NKG2D	4.49×10^{-19}	1.65
	ULBP3	Ligando activador de NKG2D	4.43×10^{-17}	1.52
9q31.1 	STX17	Canas prematuras	3.60×10^{-07}	1.33
10p15.1 	IL2RA (CD25)	Proliferación de células T	1.74×10^{-12}	1.41
11q13 	PRDX5	Enzima antioxidante	4.14×10^{-07}	1.33
12q13 	Eos (IKZF4)	Proliferación de células T	3.21×10^{-08}	1.34
	ERBB3	receptor del factor de crecimiento epidérmico	1.27×10^{-07}	1.34
6p21.32 	MICA	Ligando activador de NKG2D	1.19×10^{-07}	1.44
(HLA)	NOTCH4	Diferenciación de células T	1.03×10^{-08}	1.61
	C6orf10		1.45×10^{-16}	2.36
	BTNL2	Proliferación de células T	2.11×10^{-26}	2.70
	HLA-DRA	Presentación de antígeno	2.93×10^{-31}	2.62
	HLA-DQA1	Presentación de antígeno	3.60×10^{-17}	2.15
	HLA-DQA2	Presentación de antígeno	1.38×10^{-35}	5.43
	HLA-DQB2	Presentación de antígeno	1.73×10^{-13}	1.60
	HLA-DOB	Presentación de antígeno	2.07×10^{-08}	1.72

Las vías comunes con otras enfermedades autoinmunes, que incluyen ligandos NK en los órganos diana incluyen las siguientes:

- En la AR, los sinoviocitos expresan aberrantemente ligandos MIC, lo que conduce a la estimulación de células T autorreactivas.
- En la enfermedad celíaca, los ligandos MIC se sobreexpresan en el epitelio intestinal durante la enfermedad activa.
- En la diabetes tipo 1, las células de los islotes en ratones NOD prediabéticos expresan el ligando RAE-1.

La expresión aberrante de ligandos activadores de NK en individuos genéticamente predispuestos puede inducir o exacerbar la enfermedad.

Las vías candidatas en AA que presentan nuevas oportunidades para la terapia incluyen las siguientes:

• Miembros de la familia de receptores coestimuladores, que tienen efectos complementarios sobre la activación de las células T, y su equilibrio controla el resultado general de las respuestas inmunes y autoinmunes.

• Genes que mejoran la respuesta citotóxica de las células NK; desencadena las células T para producir citoquinas proinflamatorias; e induce a las células T CD4(+) a diferenciarse en células Th17.

• Genes que desempeñan un papel fundamental en la regulación del sistema inmune adaptativo mediante el control de la supervivencia y la proliferación de las células T (Treg) reguladoras, que son necesarias para el mantenimiento de la tolerancia inmune.

• Receptores activadores expresados en células asesinas naturales (NK), células T NK1.1 (+) y células T. Los ligandos de NKG2D incluyen MHC clase I relacionada con la cadena (MIC) A, MICB.

Los compuestos candidatos para el tratamiento de AA incluyen compuestos dirigidos a la señalización Jak/Stat se describen en Ivanenkov et al., Mini Rev Med Chem. Enero de 2011; 11(1): 55-78.

Ejemplo 2

Se realizarán los siguientes estudios genéticos:

• Un estudio de replicación con otros 1000 pacientes con AA.

• Secuenciación profunda de las regiones candidatas.

• Recolección de 10,000 pacientes.

• Estudios genéticos comunes T1D, CeO y AA

Se realizará un estudio de inmunología con ligandos activadores de NK usando transgénicos inducibles por ULBP3, ULBP6, nuevos modelos de ratones.

Tabla 6: Genes con significación nominal en los estudios GWAS

	Gen	Mb	Recuento de SNPs <1x10 ⁻⁴	Valor p mínimo observado	Valor p mínimo imputado	Informes autoinmune	Clasificación GO
	Cromosoma 2						
	HDAC4	240.03	1	8.10E-05	5.59E-05		Respuesta inflamatoria
	Cromosoma 3						
	CACNA2D3	55.02	1	7.28E-05	1.47E-05	CeD	
	Cromosoma 5						
	IL13	132.02	2	1.87E-06		Asma	respuesta inmune
	Cromosoma 6						
	HLA-G	29.94	1	1.07E-04	4.54E-06	RA, MS, SLE, PS, T1D, Asma,	respuesta inmune
	HLA-A	30.01	1	1.00E-04	2.72E-05	MS, T1D, PS, GD, Asma, Vitiligo	respuesta inmune
	MICB	31.59	2	1.89E-05	1.97E-05	MS, T1D, UC, RA, CeD, Asma	respuesta inmune
	TAP2	32.91	1	6.42E-06	1.28E-05	T1D, RA, SLE, PS, GD	respuesta inmune

(continuación)

	Gen	Mb	Recuento de SNPs <1x10 ⁻⁴	Valor p mínimo observado	Valor p mínimo imputado	Informes autoinmune	Clasificación GO
Cromosoma 7							
	IL6	22.72	2	7.72E-05	4.34E-05	RA, T1D, CeD	Respuesta inflamatoria
	CHCHD3	132.44	1	3.07E-05	2.02E-05	CeD	
Cromosoma 8							
	CSMD1	3.02	1	8.65E-05	8.38E-05	CeD, MS, PS	
Cromosoma 12							
	IFNG	66.84	1	1.55E-05	1.29E-05	CeD, T1D, RA, MS, SLE, PS, GD, Asma	
	IL26	66.87	2	7.18E-05	6.45E-05	MS, Asma	respuesta inmune
Cromosoma 16							
	KIAA0350 (CLEC16A)	11.11	6	1.77E-05	1.15E-05	T1D, MS, Enfermedad de tiroides	
	SOCS1	11.24	2	1.16E-05	8.66E-06	CeD, T1D, Asma	
Cromosoma 18							
	ANKRD12	9.25	2	3.59E-05	1.55E-05		
	PTPN2	12.80	1	4.09E-06	3.38E-07	CD, T1D	

5

Tabla 7: Análisis de vías de genes nominales (véase <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

Categoría	Término	Genes
hsa05332	Enfermedad de injerto contra huésped	IL6, IFNG, HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa04612	Procesamiento y presentación de antígenos	HSPA1L, TAP2, HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa04630	Ruta de señalización Jak-STAT	SPRY2, IL6, SOCS1, IFNG, IL26, IL13
hsa05330	Rechazo de aloinjerto	IFNG, HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa04940	Diabetes mellitus tipo I	IFNG, HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa04650	Citotoxicidad mediada por células asesinas naturales	MICB, IFNG, HLA-A, HLA-G
hsa05320	Enfermedad tiroidea autoinmune	HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa05416	Miocarditis viral	HLA-A, HLA-DMA, HLA-G
hsa04060	Interacción citoquina-receptor de citoquina	IL6, IFNG, IL26, IL13

Ejemplo 3- Muestras de estudio, genotipificación, control de calidad y estratificación de la población.

10

La alopecia areata (AA) es un problema médico importante y es la enfermedad autoinmune más prevalente en los Estados Unidos (Tabla 8), que afecta a aproximadamente 4.6 millones de personas, incluidos hombres y mujeres de todos los grupos étnicos, con un riesgo de por vida del 1.7% (Kyriakis KP, Paltatzidou K, Kosma E, Sofouri E, Tadros A, Rachioti E. Alopecia areata prevalence by gender and age. J Eur Acad Dermatol Venereol. 23: 572-3, 2009). Además, la AA representa la segunda forma más común de pérdida de cabello humano, solo superada por la alopecia androgenética, y causa desfiguración significativa y angustia psicológica a las personas afectadas (Figura 1). La AA afecta a más individuos que la mayoría de las otras enfermedades autoinmunes combinadas, incluido el lupus

15

eritematoso (LE), la diabetes tipo 1 (T1D), la psoriasis, la esclerosis múltiple (EM) y la artritis reumatoide (AR) (Tabla 8).

Tabla 8. Prevalencia de enfermedades autoinmunes

Enfermedad Autoinmune	Tasa por 100.000
Alopecia Areata	1700
Psoriasis	696-1527
Artritis reumatoide	310-800
Diabetes Tipo 1	227-355
Esclerosis múltiple	177-358
Lupus eritematoso sistémico	34-150

5 En marcado contraste con estas otras condiciones, la investigación sobre la patogénesis y el desarrollo de terapias innovadoras en la AA ha quedado muy rezagada. Esto puede deberse en parte a la percepción de que la AA es simplemente un trastorno cosmético. En realidad, la AA lleva una de las cargas más altas entre las enfermedades de la piel, particularmente entre niños y adolescentes cuya autoimagen está tan estrechamente relacionada con su apariencia (Bickers DR, Lim HW, Margolis D, Weinstock MA, Goodman C, Faulkner E, Gould C, Gemmen E, Dall T; American Academy of Dermatology Association; Society for Investigative Dermatology. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. J Am Acad Dermatol. 55: 490-5, 2006).

15 A pesar de su alta prevalencia, no hay tratamientos basados en la evidencia para AA. Una evaluación exhaustiva del análisis Cochrane de diecisiete ensayos clínicos aleatorizados (ECA) con un total de 540 participantes no encontró tratamiento comprobado de AA (Delamere FM, Sladden MM, Dobbins HM, Leonardi-Bee J. Interventions for alopecia areata. Cochrane Database Syst Rev. 2: CD004413, 2008). Cada ensayo incluyó de 6 a 85 participantes y evaluó una variedad de intervenciones que incluyeron corticosteroides tópicos y orales, ciclosporina tópica, terapia fotodinámica y minoxidil tópico. En general, ninguna de las intervenciones mostró un beneficio significativo del tratamiento en términos de crecimiento del cabello en comparación con el placebo. Se concluyó que pocos (si los hay) tratamientos para AA han demostrado ser efectivos. No se encontraron ECA sobre el uso de difenciprona, dinitroclorobenceno, corticosteroides intralesionales o ditanol, aunque estos medicamentos se usan comúnmente para el tratamiento de AA. Del mismo modo, aunque los corticosteroides tópicos y el minoxidil se prescriben ampliamente y parecen ser seguros, no hay evidencia convincente de que sean beneficiosos a largo plazo. La mayoría de los ensayos han sido mal informados y/o son tan pequeños que cualquier beneficio clínico importante no es concluyente. Estas observaciones subrayan la importancia de definir la base genética de AA y determinar su patogénesis, de modo que se puedan desarrollar metodologías terapéuticas racionales y se pueda comenzar la investigación traslacional.

30 Evaluación preclínica de la focalización Jak/Stat en Alopecia Areata

El receptor NKG2D (NKG2D), funciona para eliminar las células que emiten señales de peligro y la desregulación de este proceso de reconocimiento a menudo conduce al desarrollo de autoinmunidad. Se perseguirán las influencias de la inhibición de JAK y NF-kb, donde, sin estar limitado por la teoría, la expresión de NKG2DL se inhibirá a nivel transcripcional. INCB18424, un inhibidor de JAK1/JAK2 (po/tópico), se encuentra en ensayos clínicos de fase II para trastornos mieloproliferativos/mielofibrosis y en psoriasis.

Tabla 9: Inhibidores de moléculas pequeñas de Jak1/Jak2

Moléculas pequeñas				
Inhibidor JAK1/JAK2 (INCB18424)	PTKi: Antagonista competitivo de hendidura de unión a ATP	Señalización de interferón	Tópica	Fase II/Psoriasis

40 Los estudios de GWAS revelaron una serie de loci de riesgo compartidos con otras formas de autoinmunidad, tales como artritis reumatoide (AR), diabetes tipo I (T1D), enfermedad celíaca (CeD), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple (MS) y psoriasis (PS), en particular, CTLA-4, IL2/IL2RA, IL21 y genes críticos para el mantenimiento de Treg.

45 Una base genética de AA proporciona vías de exploración para terapias basadas en los mecanismos subyacentes de AA. Dichas terapias se centrarán no solo en subconjuntos de células T y mecanismos comunes a otras formas de autoinmunidad, sino también en mecanismos únicos que involucran vías de señalización de Jak1/Jak2 y efectores posteriores.

El origen de la autoinmunidad en AA puede residir en el folículo piloso mismo. Los estudios en este documento se centran en definir señales de peligro putativas en el folículo piloso que contribuyen a la patogénesis de AA. También se identificarán los alelos patógenos que residen dentro del MHC, que pueden contribuir a la desregulación inmune que impulsa la patogénesis de AA. Esto puede deberse en parte a la importancia de las células presentadoras de antígeno (APC) en la presentación de señales de peligro como neoantígenos para el sistema inmune.

Se investigarán los mecanismos de señalización Jak1/Jak2, y se evaluará la importancia de las interacciones Jak1/Jak2/Stat1/Stat2 como impulsores de la inducción de la enfermedad. Se seguirán las metodologías farmacológicas que interrumpan la señalización Jak1/Jak2 /Stat1/Stat2.

Los ratones deficientes en C3H IFN- γ están protegidos del desarrollo de AA. Se muestra que los IFN son capaces de regular al alza NKG2DL en queratinocitos y fibroblastos dérmicos humanos cultivados. La reticulación adicional de NKG2D induce la producción de IFN- γ por las células T innatas NK, NKT y $\gamma\delta$, creando así un potencial circuito de retroalimentación positiva, que impulsa la inmunidad autorreactiva adaptativa. Por lo tanto, la transferencia adoptiva y los experimentos de agotamiento/bloqueo de anticuerpos definirán las células que llevan NKG2D involucradas.

Se examinarán las intervenciones farmacológicas dirigidas a la interrupción del eje CD8 NKG2D. Se buscará interferir con la regulación positiva de NKG2DL o la activación de células que llevan NKG2D son metodologías racionales. Se muestra que la ruta IFN $\rightarrow$ JAK/STAT puede inducir la expresión de NKG2DL.

Se evaluará si la ruta IFN $\rightarrow$ JAK/STAT es fundamental para la inducción de NKG2DL en piel normal y enferma. La Ruta de señalización IFN JAK/STAT puede inhibirse eficazmente con inhibidores tópicos de JAK1/JAK2, incluido un agente que ha tenido un éxito clínico temprano en la psoriasis. Si la respuesta al interferón tipo I subyace a la regulación positiva del ligando NKG2D, los inhibidores de JAK1/JAK2 pueden bloquear esta inducción, así como bloquear los componentes dependientes de IFN-gamma de la respuesta inmune adaptativa.

Referencias

1. Safavi KH, Muller SA, Suman VJ, Moshell AN, Melton LJ, 3rd. Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clin Proc* 1995;70:628-33.
2. Jelinek JE. Sudden whitening of the hair. *Bull N Y Acad Med* 1972;48:1003-13.
3. Ito T, Ito N, Saatoff M, et al. Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. *The Journal of investigative dermatology* 2008; 128:1196-206.
4. Todes-Taylor N, Turner R, Wood GS, Stratte PT, Morhenn VB. T cell subpopulations in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11:216-23.
5. Gilhar A, Landau M, Assy B, et al. Transfer of alopecia areata in the human scalp graft/Prkdc(scid) (SCID) mouse system is characterized by a TH1 response. *Clin Immunol* 2003;106:181-7.
6. Gilhar A, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S, Kalish RS. Alopecia areata is a T-lymphocyte mediated autoimmune disease: lesional human T-lymphocytes transfer alopecia areata to human skin grafts on SCID mice. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:207-10.
7. Zoller M, McElwee KJ, Engel P, Hoffmann R. Transient CD44 variant isoform expression and reduction in CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in C3H/HeJ mice with alopecia areata. *The Journal of investigative dermatology* 2002; 118:983-92.
8. McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Hoffmann R, et al. Transfer of CD8(+) cells induces localized hair loss whereas CD4(+)/CD25(-) cells promote systemic alopecia areata and CD4(+)/CD25(+) cells blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. *The Journal of investigative dermatology* 2005;124:947-57.
9. Ito T, Meyer KC, Ito N, Paus R. Immune privilege and the skin. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:27-52.
10. McDonagh AJ, Tazi-Ahnini R. Epidemiology and genetics of alopecia areata. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:405-9.
11. van der Steen P, Traupe H, Happle R, Boezeman J, Strater R, Hamm H. The genetic risk for alopecia areata in first degree relatives of severely affected patients. An estimate. *Acta Derm Venereol* 1992;72:373-5.
12. Jackow C, Puffer N, Hordinsky M, Nelson J, Tarrand J, Duvic M. Alopecia areata and cytomegalovirus infection in twins: genes versus environment? *J Am Acad Dermatol* 1998;38:418-25.
13. Martinez-Mir A, Zlotogorski A, Gordon D, et al. Genomewide scan for linkage reveals evidence of several susceptibility loci for alopecia areata. *Am J Hum Genet* 2007;80:316-28.

14. Nakamura et al., 2008, Controlled Delivery of T-box21 Small Interfering RNA Ameliorates Autoimmune Alopecia (Alopecia Areata) in a C3H/HeJ Mouse Model, *Am J Pathol.*, 172(3): 650-658.

15. Freyschmidt-Paul, K.J. McElwee, R. Hoffmann¹, J.P. Sundberg, M. Vitacolonna, S. Kissling, M. Zöller, 2006, Interferon-gamma-deficient mice are resistant to the development of alopecia areata, *Br J Dermatol.*, 155(3):515-21.

16. Gilhar A., Kam Y., Assy B. and Kalish R., 2005, Alopecia areata induced in C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege, *Journal Invest. Dermatol.*, 124(1):288-9.

17. Wong et al., 2005, Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for Asma, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5(3):264-71.

18. Mourich and Iverson, 2009, Splicing in the immune system: Potential targets for therapeutic intervention by antisense-mediated alternative splicing, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 11(2): 124-132.

19. Jin et al., 2010, Variant of TYR and Autoimmunity Susceptibility Loci in Generalized Vitiligo, *NEJM*, 362:1686-1697.

Ejemplo 4

Los mecanismos autoinmunes específicos subyacentes a la alopecia areata (AA) han permanecido sin claridad y, por lo tanto, la investigación clínica de AA históricamente se ha quedado atrás de otras enfermedades autoinmunes. A pesar de la gran cantidad de nuevos bioterapéuticos disponibles para la evaluación clínica en autoinmunidad, los esteroides intralesionales o sistémicos siguen siendo el estándar de atención y solo se han publicado dos pequeños ensayos clínicos aleatorios en la última década. Las ideas proporcionadas por el descubrimiento de los genes GWAS proporcionan una hoja de ruta para cerrar esta brecha, al investigar las vías inmunológicas identificadas por GWAS, tanto por su relevancia mecanicista como terapéutica.

Identificar terapias eficaces, clínicamente relevantes, en modelos de ratón de alopecia areata. En el estado normal, los folículos capilares (HF) representan un santuario inmune privilegiado (IP), que expresa poca o ninguna molécula clásica de HLA clase I. En AA activa, el estado de IP se pierde, ya que la expresión de HLA clase I y la expresión del ligando NKG2D están marcadamente reguladas. Dada la fuerte asociación genética de los loci de ligando de NKG2D con AA humana, sin estar atados por la teoría, la regulación ascendente de NKG2DL aberrante y la activación persistente de NKG2D en las células efectoras inmunes impulsa la iniciación y progresión inflamatoria de AA. Sin estar obligado por la teoría, en AA, como para la enfermedad celíaca, IL-15 puede impulsar la diferenciación del efector de células T CD8 permitiendo una citotoxicidad CD8 "tipo NK" promiscua. De hecho, las señales inflamatorias locales de HF IL-15/NKG2DL están acompañadas por un denso infiltrado de células T CD8⁺ que expresan marcadores NK, probablemente los efectores inmunes a AA críticos responsables de la producción de IFN γ y la citotoxicidad de HF. Estas observaciones colectivas, realizadas tanto en humanos como en ratones, invitan a la evaluación terapéutica.

El potencial terapéutico de bloquear la reprogramación y la citotoxicidad de tipo NK al interferir con las citoquinas relevantes (IFN- γ y las vías de señalización del inmunorreceptor relevantes (NKG2D). Un modelo de alopecia de injerto en el que todos los ratones C3H injertados desarrollan AA de manera oportuna, se utilizará durante 12 semanas. Esto acelera en gran medida la detección de drogas ya que la evaluación de la prevención/reversión de la enfermedad espontánea en C3H/HeJ no es práctica dado el inicio tardío (>6 meses de edad) y la baja incidencia acumulativa (15%). Se evaluarán las metodologías de molécula pequeña, que tienen la ventaja de un suministro tópico potencial, y proteínas bioterapéuticas (anticuerpos) que tienen una especificidad biológica superior. Los objetivos generales son utilizar bioterapéuticos para establecer rutas inmunes críticas que podrían ser el objetivo de metodologías tópicos de moléculas pequeñas más clínicamente sostenibles.

Identificar los biomarcadores AA asociados con la enfermedad y su reversión con una terapia eficaz en ratones C3H. Las metodologías que usan GWAS y el perfil transcripcional, por ejemplo, así como las metodologías que usan inmunotinción y FAC de subconjuntos de células T, por ejemplo, se han tomado para identificar varios biomarcadores AA patógenos en la piel y la sangre de ratones con AA. Estos estudios con ratones continuarán informando el desarrollo de una plataforma de biomarcadores de traducción en AA humana. En la piel, los estudios en ratones alopecicos C3H/HeJ demostraron que los genes inducidos por IFN están regulados de forma espectacular, incluidas las quimioquinas CXCL9-11, que probablemente sean responsables del reclutamiento de un infiltrado denso de CXCR3⁺ NKG2D productor de IFN- γ asociado a HF portadores de CD8 T efectores. Los datos espectrales proporcionan evidencia sorprendente de que estos efectores NKG2D⁺ CD8 T circulantes son células T efectoras de autoantígeno de buena fe que aumentan con la progresión de la enfermedad. La evaluación temporal de estos biomarcadores serológicos, cutáneos y celulares en ratones durante el tratamiento permitirá identificar biomarcadores inflamatorios dinámicos, mecánicamente importantes y premonitorios que predicen el resultado terapéutico e informan el descubrimiento/utilización de biomarcadores clínicos.

Validación preclínica de metodologías dirigidas utilizando tejidos humanos AA ex vivo. Para acelerar el desarrollo clínico de tratamientos que demuestren "prueba de concepto" en el modelo de ratón con AA, se utilizarán tejidos AA

humanas para la validación de objetivos y estudios correlativos. El sistema de "rastreo" proporcionará un bioensayo humano ex vivo conveniente para validar que los agentes que invierten la AA del ratón se traducen en humanos, inhibiendo efectivamente la supervivencia/expansión/función de las células T AA humanas.

Así como el ADN humano de miles de sujetos alopecicos proporcionó genes GWAS y una visión única de la enfermedad humana, los tejidos humanos, la sangre y la piel de los sujetos con AA se utilizarán para continuar interrogando estas vías inmunes genéticamente implicadas en última instancia por su utilidad terapéutica. Conceptualmente, el modelo de ratón de la alopecia areata prosigue a la humana, proporcionando los fundamentos de pruebas preclínicas para metodologías terapéuticas en la alopecia areata.

Las enfermedades autoinmunes afectan a unos 23 millones de individuos en los Estados Unidos (1) y aunque no se establece la prevalencia de AA, es una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes (2, 3). En 1999-2000, hubo una estimación de 2.4 millones de visitas al consultorio por AA, la mitad de las cuales fueron realizadas por pacientes de entre 20 y 30 años. La AA causa desfiguración significativa y angustia psicológica a las personas afectadas y conlleva una de las cargas más altas entre las enfermedades de la piel, particularmente entre los niños y adolescentes cuya autoimagen está tan estrechamente relacionada con su apariencia (4). En la actualidad, el pronóstico de AA es impredecible y no existe un tratamiento definitivo. Las terapias actuales incluyen esteroides y terapia inmunológica tópica, e inducen remisiones duraderas en solo un tercio de los pacientes (5, 6). A pesar de su alta prevalencia, una evaluación exhaustiva del análisis Cochrane concluyó que no hay tratamientos basados en la evidencia para AA (7).

En marcado contraste con otras afecciones autoinmunes, la investigación sobre la patogénesis y el desarrollo de terapias innovadoras en AA se ha quedado muy rezagada. En la era de las terapias inmunológicas dirigidas, solo se han informado dos estudios clínicos que evalúan la bioterapéutica de proteínas en AA (8, 9) (ambos dirigidos al tráfico de células T). En parte, esto se ha debido a la comprensión limitada de las vías inmunes de la AA específicas que impulsarían la evaluación de las metodologías terapéuticas racionales. Sobre la base de una nueva comprensión de la base genética y patógena se obtendrán datos preclínicos de prueba de concepto de AA que impulsarán la evaluación clínica de las metodologías terapéuticas racionales en esta enfermedad.

El estudio GWAS (10) reveló una serie de loci de riesgo compartidos con otras formas de autoinmunidad, como RA, T1D, enfermedad celíaca (CeD), SLE, MS y PS, en particular, CTLA4, IL2/IL2RA, IL21, NKG2D ligandos y genes críticos para la función Treg (Eos). La similitud genética con RA, T1D y CeD es especialmente notable a la luz de la importancia patogénica de la expresión de un ligando NK en el órgano final (sinovio, islote, intestino y piel), y la participación de la vía NKG2DL/NKG2D en la patogenia de cada una de estas tres enfermedades (11, 14). Una ventaja de los estudios inmunoterapéuticos en la piel es la relativa facilidad de acceso del órgano diana. Por lo tanto, los estudios en este documento que examinan la piel pueden proporcionar información importante sobre la citotoxicidad de CD8 desencadenada por NKG2D e IL-15, la lesión desencadenada por IFN, etc., que afectan la comprensión de estas otras enfermedades humanas relacionadas en las que el órgano diana no es accesible. De hecho, los estudios positivos en cualquiera de estas enfermedades autoinmunes que comparten una causa común pueden servir como base para tratamientos comunes.

Los mecanismos autoinmunes específicos subyacentes a la AA han permanecido oscuros más allá de la visión predominante de que es el resultado del ataque mediado por células T del folículo piloso. En el estado normal, los folículos pilosos representan un santuario inmune privilegiado (IP) (15-17), que expresa poca o ninguna molécula clásica de HLA de clase I y, en cambio, expresa los ligandos inhibitorios de HLA HLA-E y HLA-G, evitando así simultáneamente el reconocimiento inmune por la clase I restringió las células CD8 mientras regulaba negativamente las células NK, que de otro modo podrían reaccionar al "ser perdido" (16, 18-21). En AA activa, el estado de IP del folículo piloso normal no es operativo, ya que la expresión de HLA clase I está marcadamente regulada. Estudios previos han observado que los infiltrados de células T CD4 y CD8 rodean el folículo piloso en áreas alopecicas de la piel en ratones y humanos (22, 23). De hecho, la transferencia de células T totales, pero no de células B o sueros, puede transferir la enfermedad de un ratón o humano alopecico a un ratón WT (24) o SCID normal (25), lo que implica que las células T efectoras son las células patógenas. Sin embargo, los mediadores moleculares de la inflamación específica del sitio no se han identificado previamente. Con la guía de los hallazgos de GWAS y estudios inmunobiológicos previos, se proporciona una nueva visión de este trastorno autoinmune común, que conducirá al desarrollo de tratamientos innovadores y racionalmente dirigidos para satisfacer las necesidades no satisfechas de los pacientes con AA.

Vías inmunológicas AA identificadas por estudios de GWAS. Los loci genéticos más altamente significativos encontrados asociados con alopecia areata se muestran en la Tabla 10: (el área gris denota genes "nominalmente significativos"). Estos estudios seminales han sido validados en un estudio confirmatorio en una población distinta. Los genes subrayados son genes expresados en HF, mientras que los genes en negrita son genes expresados en células inmunes. En general, muchos loci susceptibles son compartidos por otros estados autoinmunes específicos de tejido, con diabetes tipo I que muestra la superposición más llamativa (columna derecha). La similitud con RA, T1D y CeD es particularmente notable, ya que se ha demostrado que NKG2D tiene un papel importante en la patogénesis de cada una de estas tres enfermedades (11-14). Por lo tanto, es probable que la comprensión de cualquiera de estos sistemas de enfermedad/modelo arroje luz sobre las vías patógenas comunes compartidas por múltiples estados autoinmunes. Los alelos más altamente significativos identificados (aparte de HLA) fueron cuatro ligandos NKG2D (UBLP-3/UBLP-

6/MICA/MICB en **negrita cursiva**) y un ligando inhibidor (HLA-G). El receptor NKG2D (NKG2D), funciona para eliminar las células que emiten señales de peligro y la desregulación de este proceso de reconocimiento a menudo conduce al desarrollo de la autoinmunidad (26). Otros genes expresados en HF que contribuyen al riesgo incluyen HLA, genes de procesamiento de antígeno (TAP) y PRDX/STX17.

5

2q33.2	CTLA4	Inhibición costim	3.6×10^{-13}	T1D, RA, CeD, MS, SLE, GD
	ICOS	Células T costim	4.3×10^{-08}	T1D, RA, CeD, MS, SLE
4q27	IL21	Función NK/Th17	4.3×10^{-08}	T1D, RA, CeD, PS
	IL2	Células T/T reg. prolif.	3.0×10^{-04}	T1D, RA, CD, MS, CD, SLE, PS, GD
6q25.1	ULBP6	Ligandos NK G2D	4.5×10^{-19}	Ninguno
	ULBP3	Ligandos NK G2D	4.4×10^{-17}	Ninguno
9q31.1	STX17	Encanecimiento	3.6×10^{-07}	Ninguno
10p15	IL2RA	Prolif. célula T/Treg	1.7×10^{-12}	T1D, MS, GD
11q13	PRDX5	Enz antiox	4.1×10^{-07}	MS
12q13	Eos	T-reg programa ing.	3.2×10^{-08}	T1D, SLE
6p21.3	MICA	Ligando NK G2D	1.2×10^{-07}	T1D, RA, CeD, UC, PS, SLE
(HLA)	NOTCH4	Hematopoyesis	1.0×10^{-08}	T1D, RA, MS
	BTNL2	T-células costim.	2.1×10^{-26}	T1D, RA, UC, CD, SLE, MS
	HLA-DRA	Presentación Ag	2.9×10^{-31}	T1D, RA, CeD, MS
	HLA-DQA1	Presentación Ag	3.6×10^{-17}	T1D, RA, CeD, MS, SLE, PS, CD, UC, GD
	HLA-DQA2	Presentación Ag	1.4×10^{-35}	T1D, RA
	HLA-DQB2	Presentación Ag	1.7×10^{-13}	RA
	HLA-DOB	Presentación Ag	2.1×10^{-08}	SLE
5	IL-13	Polarización Th2	1.9×10^{-05}	Asma
6	HLA-G	Inhibición NK G2A	1.0×10^{-04}	RA, MS, SLE, PS, T1D, Asma
	HLA-A	Presentación Ag	1.0×10^{-04}	MS, T1D, PS, RA, GD, Asma, Vitiligo
	MICB	Ligandos NK G2D	1.9×10^{-05}	MS, T1D, UC, RA, CeD, Asma
	TAP2	Presentación Ag	6.4×10^{-06}	T1D, RA, SLE, PS, GD
7	IL6	Inflamación	7.7×10^{-05}	RA, T1D, CeD
12	IFNG	Th1/inflamación	1.5×10^{-05}	CD, T1D, RA, MS, SLE, PS, GD, Asma
	IL26	Polarización T	7.2×10^{-05}	MS, Asma
16	CLEC16A	Receptor de lecitina tipo C	1.8×10^{-05}	T1D, MS, GD
	SOCS1	JAK/STAT inh	1.2×10^{-05}	CeD, T1D, Asma
18	PTPN2	Fosfatasa	4.2×10^{-06}	CeD, T1D

Tabla 10: Loci genéticos asociados con AA

La producción de IFN- γ por los efectores CD8 que llevan NKG2D activados puede revertir el privilegio inmunológico y perpetuar el circuito inflamatorio.

10

Las rutas relacionadas con IFN- γ pueden debilitarse con la terapéutica existente bajo investigación clínica, lo que agiliza la ruta de traducción. En los últimos diez años, varios inhibidores de moléculas pequeñas de proteínas tirosina

quinasas (PTKi) han sido desarrollados con éxito clínicamente tanto para el suministro oral como tópico. Se utilizarán metodologías PTKi para bloquear las respuestas inflamatorias mediadas por CD8 en AA, a saber, la inhibición de la señalización JAK/STAT, responsable de la capacidad de respuesta de las citoquinas, corriente abajo de la citoquina efectora CD8 IFN- γ .

5 Identificar terapias clínicamente relevantes dirigidas a respuestas de células T efectoras en ratones alopécicos

Usando análisis de inmunotinción y citometría de flujo de poblaciones celulares totales de piel con AA, se encontraron células T CD8⁺NKG2D⁺ infiltrando el folículo piloso (figura 17) y expandidas en piel con AA pero no normal (figura 18 y figura 4A). Además, los ratones con AA exhiben linfadenopatía cutánea, al menos en parte debido a la expansión sistémica dramática de la población CD8⁺ NKG2D⁺, tanto en el ganglio linfático cutáneo AA como en la sangre, lo que representa totalmente 6+/-1% del total de células LN son 2.4+/-1.3% del total de PBMC, cada una más de diez veces mayor que la observada en ratones C3H normales. Estas células T CD8⁺NKG2D⁺ son potentemente citotóxicas contra las células de la vaina dérmica de HF (Figura 21). El análisis inmunofenotípico adicional de las células T CD8⁺NKG2D⁺ reveló que esta población expresaba el marcador de memoria T CD44⁺ y múltiples "marcadores NK", incluidos DX5, NKG2A/C/E y Nkp46 (Figura 19).

Para proporcionar pruebas de que la población circulante de CD8⁺NKG2D⁺ representaba la población efectora "específica de AA" bona fide, sin estar vinculados por la teoría, las células T CD8⁺ NKG2D⁺ encontradas en el ganglio linfático pueden expresar un repertorio de TCR similar al total de células T que se encuentran infiltradas en la piel con AA. La Figura 20 muestra que las poblaciones de ganglios linfáticos CD8⁺NKG2D⁺ exhiben una distribución normal de longitudes de CDR, un patrón que refleja una población de células T policlonales no restringida. Por el contrario, el repertorio de TCR de las células T de la piel está altamente restringido con casi todos los miembros de la familia V β dominados por un pequeño número de longitudes de CDR, indicativo de una población oligoclonal de células T impulsadas por antígeno. Las células T CD8⁺NKG2D⁺ de las células de los ganglios linfáticos cutáneos también están muy restringidas y muestran un patrón sorprendentemente similar con las células T cutáneas totales.

Estos datos confirman que las células T CD8⁺NKG2D⁺ contienen la mayoría de las poblaciones de células T oligoclonales encontradas en la piel. Además, la evidencia de la expansión de las células T oligoclonales comunes en la piel y los ganglios linfáticos argumenta en contra de la posibilidad de que estas poblaciones LN (o incluso marcadores) se expandan/activen como un proceso reactivo a eventos inflamatorios. Por ejemplo, las células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) también aumentan en número en los ganglios linfáticos AA, sin embargo, este es probablemente un proceso reactivo, ya que su tipo de espectro es diverso y diferente de los presentes en la piel. Nótese que algunos TCR/clones se encuentran en la piel, pero no en el drenaje de los ganglios linfáticos cutáneos, por ejemplo, V β 10. Estos probablemente incluyen poblaciones de células T CD4⁺ que se encuentran en la piel con AA pero que no están presentes en la fracción CD8⁺ LN clasificada. Estos datos establecen que las células T CD8⁺NKG2D⁺ son los efectores patógenos NKG2D⁺ en AA de ratón, estableciendo un paralelo del modelo de ratón con AA humana.

40 Modelo AA preclínico para establecer una prueba de concepto para metodologías terapéuticas in vivo

Modelo de injerto de piel C3H/HeJ: El modelo de ratón C3H/HeJ para alopecia areata se ha estudiado desde que se informó por primera vez de este modelo en 1994 (29, 30, 31). Si bien se encontraron otros modelos de ratones para la alopecia areata (32), este modelo sigue siendo el más estudiado y utilizado en el campo hoy en día. Después de haber realizado una variedad de ensayos farmacológicos con este modelo a lo largo de los años (33), se han optimizado una variedad de protocolos (34).

El injerto de piel de grosor completo de ratones C3H/HeJ alopécicos a ratones hembra C3H/HeJ no afectados de 2-3 meses de edad da como resultado alopecia irregular durante las 10 semanas de injerto en todos los receptores, que progresa a alopecia generalizada a las 20 semanas. Se emplea una variedad de sistemas de puntuación histológica integrales y eficientes que se basan en el entrenamiento tradicional de los histopatólogos donde el adjetivo utilizado en las descripciones (normal, 0; leve, 1; moderado, 2; severo, 3; y extremo, 4) se convierte en un valor numérico para la importación en una base de datos relacional (Mouse Disease Information System [o MoDIS]: <http://research.jax.org/faculty/sundberg/registration.php>) (35, 36). Esta base de datos se puede exportar a través de Excel para importarla a un análisis estadístico u otro programa de software. La alopecia areata se clasifica según la gravedad, la ubicación de las células inflamatorias, los tipos y el número relativo de células inflamatorias (granulocitos, mastocitos, linfocitos), distrofia folicular, etc. Se incorporarán en este panel biomarcadores de proteínas y ARN moleculares, y generación y análisis de esta base de datos de variables múltiples se realizará.

60 Protocolo #1: en el entorno de prevención, los ratones receptores serán tratados a partir de la primera semana después del injerto.

Protocolo #2: Para el tratamiento, los ratones injertados con AA establecido tempranamente serán tratados para revertir la progresión de AA.

65 Los agentes se examinarán primero en el modelo de prevención. Los agentes que previenen con éxito la AA luego avanzarán a una evaluación secundaria en el contexto de una enfermedad establecida, mientras que aquellos que no

pasen la primera prueba serán descartados, permitiendo la entrada de otras metodologías innovadoras. Los siguientes son las metodologías terapéuticas iniciales, tanto biológicos específicos como moléculas pequeñas, elegidos para la evaluación preclínica.

- 5 Se probarán inhibidores de la molécula pequeña de la proteína JAK de la tripsina quinasa (PTKis) que se dirigen a las rutas de activación involucradas en la respuesta del efector T. Estos PTKis ya se encuentran en ensayos clínicos de fase III que facilitan la traducción y el posible desarrollo clínico de los tópicos dirigidos a células T "tipo NK".

Intervenciones terapéuticas con intervenciones de molécula pequeña de PTKi

- 10 El suministro tópico tiene ventajas obvias para limitar las exposiciones y toxicidades sistémicas. Los estudios preclínicos y clínicos han demostrado que el suministro de PTKi de molécula pequeña en crema puede superar la barrera cutánea y alcanzar concentraciones locales efectivas en la dermis con una exposición sistémica limitada (78). Las PTK clave fundamentales para las respuestas efectoras T en AA serán direccionadas, a saber, la citoquina IFN γ .

- 15 Direccionar IFNs con inhibidores Jak1/2: Los interferones son un objetivo terapéutico atractivo en AA ya que probablemente participan en varios pasos en la respuesta inflamatoria; incluyendo la eliminación del privilegio inmunológico de HF e inducir la respuesta inflamatoria celular. Los interferones sobreexpresan varias moléculas proinflamatorias relevantes en el órgano del extremo del folículo piloso, incluyendo NKG2DL, moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM-1), procesamiento/presentación antigénica (TAP1/2, LMP, proteosoma, MHC I y II) y además impulsan respuesta efectora del sistema inmune (aumento de las respuestas de tipo Th1, activación DC y citotoxicidad mediada por IFN- γ). En el modelo de ratón C3H-HeJ de AA, se requiere IFN- γ para la patogénesis (89, 90) y la administración de interferón- γ acelera la enfermedad (91). Es importante destacar que la administración de anticuerpos neutralizantes de IFN- γ revierte la patogénesis de AA en el ratón C3H-HeJ (92, 93). Del mismo modo, en humanos, la alopecia areata se ha observado en varias series como un efecto secundario de la terapia con interferón tipo I (94-104) y los perfiles de transcripción de la piel humana AA han observado una respuesta IFN tipo I en biopsias de lesiones (105) y Th1 sesgado y citoquinas/quimioquinas con respuesta de IFN elevada en la sangre periférica (Figuras 22, 23) (106-110) y revisado en (111). Las células T obtenidas de los explantes de biopsia de piel con AA eran células CD8⁺NKG2D⁺ de manera uniforme y cuando se estimulaban producían IFN- γ (Figura 21A) pero no IL-4 o IL-17. En marcado contraste, la mayoría de las células T obtenidas de los explantes normales de la piel son CD4⁺ (112, 113). La situación es similar en ratones con AA, las células T CD8 productoras de IFN- γ se expanden en el ganglio linfático cutáneo (Figuras 19, 21). En la piel, nuestros estudios de perfiles de transcripción de la piel total aislada de la piel C3H con lesiones versus sin lesiones ha identificado una respuesta de interferón como la firma dominante con 17 de los 20 genes regulados al alza que son genes de respuesta a interferón (Figura 22). De hecho, los IFN regulan al alza la expresión de NKG2DL en los objetivos del folículo piloso, cerrando un círculo patogénico mediado por IFN, en el que el IFN- γ producido por los efectores CD8 impulsa los ligandos HF NKG2D que conducen a la activación de CD8⁺NKG2D⁺.

- 40 Inhibidores clínicos de JAK1/2: Tanto los anticuerpos de bloqueo (114, 115) como las PTKis de molécula pequeña están en desarrollo clínico dirigidos a la respuesta de IFN en autoinmunidad. La activación de STAT1/2 inducida por IFN está mediada por las quinasas Jak1/Jak2/Tyk y han surgido datos clínicos utilizando PTKis Jak1/Jak2 orales en varias afecciones autoinmunes, incluyendo AR y psoriasis. Las terapias tópicas tienen la ventaja adicional de un índice terapéutico mejorado que limita el potencial de inmunosupresión sistémica. INCB018424 inhibe Jak1 y Jak2 (IC₅₀=1nM) y es el único inhibidor tópico de JAK (78) actualmente en investigación clínica y su perfil de seguridad hasta la fecha ha sido aceptable. La prueba de concepto con administración oral se ha demostrado en una enfermedad dependiente de Jak (mielofibrosis) (116) y en una enfermedad dermatológica impulsada por la producción local de citoquinas (modelos de psoriasis) (78). En sujetos con psoriasis, el INCB018424 tópico indujo respuestas clínicas rápidas y la normalización de las respuestas cutáneas a citoquinas Th1/Th17 (datos no publicados de clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00820950). En conjunto, el INCB018424 tópico es una intervención segura que se predice que tiene eficacia en la alopecia areata, un estado inflamatorio dominado por una firma de IFN.

- 55 Metodología: Protocolo #1: Suministro sistémico de INCB018424: Dos veces al día (90 mg/kg) la sonda orogástrica proporciona una buena exposición sistémica dada la vida media $t_{1/2}$ de 3-6 horas en el roedor. De esta manera, se puede evaluar si la inhibición de JAK1/2 previene la progresión de AA.

- 60 Protocolo #2: administración tópica de INCB018424 (1.5%): Inversión de parches AA por inhibidor tópico JAK1/JAK2. El tratamiento tópico diario (78) comenzará a nuevas áreas irregulares afectadas en ratones injertados que comienzan a emerger 6-10 semanas después del injerto. El tratamiento tópico puede restringirse a áreas específicas de la piel del ratón mediante un vendaje apropiado para evitar exposiciones sistémicas de acicalamiento, lamido, etc. Es importante destacar que al tratar las áreas afectadas se puede evaluar la cuestión clínicamente relevante de si la exposición tópica puede revertir la progresión de AA.

Identificación de biomarcadores murinos de la actividad de la enfermedad AA que reportan la investigación clínica.

- 65 La identificación de eventos inmunológicos que acompañan el resultado del tratamiento en estos estudios preclínicos es importante, tanto para validar el mecanismo de acción propuesto como para proporcionar biomarcadores útiles que

informarán la evaluación clínica potencial de estas mismas terapias en pacientes con AA. Dado que en la evaluación clínica, las bioespecificaciones se limitarán a muestras de sangre y piel, la atención se centrará en los biomarcadores de ratón en el ratón que se pueden tomar fácilmente de estos sitios. Las metodologías que usan GWAS y el perfil transcripcional, por ejemplo, así como las metodologías que usan inmunotinción y FAC de subconjuntos de células T, por ejemplo, se han tomado para identificar varios biomarcadores patógenos en la piel y la sangre de ratones con AA. Los estudios en ratones alopecicos C3H/HeJ ya han identificado varios biomarcadores cutáneos regulados al alza en AA, como los genes inducidos por IFN (Figura 22). Los datos de tipo espectral (figura 20) han proporcionado pruebas sorprendentes de que estos efectores NKG2D⁺ CD8 T circulantes son células T efectoras accionadas por autoantígeno de buena fe. La evaluación temporal de estos biomarcadores serológicos, cutáneos y celulares en ratones, con y sin tratamiento, permitirá identificar biomarcadores inflamatorios proféticos dinámicos, mecánicamente importantes, que predicen el resultado terapéutico e informan el descubrimiento/utilización de biomarcadores clínicos.

Biomarcadores celulares de efectores inmunes circulantes en AA: Las células T CD8 "tipo NK" se expanden en la piel, la sangre y los ganglios linfáticos en ratones con AA y son una herramienta valiosa para investigar la patogénesis. Además, el subconjunto celular parece directamente relevante para la enfermedad humana.

Inmunomonitorización basada en espectros: Las células T CD8 de tipo NK se identificarán en ratones con AA en la circulación por citometría de flujo de 50 µl de sangre completa (Figura 18). Los números totales y el tipo de espectro de este subconjunto de células T clasificadas CD8⁺NKG2D⁺, se evaluarán cada tres semanas después del injerto para monitorizar la evolución de la dominación clonal/propagación del epítipo dentro de un solo ratón. El análisis espectral se utilizará para confirmar que la pérdida inmunofenotípica de las células T CD8⁺NKG2D⁺ se debe a la eliminación relacionada con el tratamiento de los clones de células T alopecicas circulantes. Esta metodología de inmunomonitorización no invasiva se utilizará para seguir a los ratones en todos los tratamientos. Por ejemplo, 3 semanas de tratamiento con el inhibidor JAK1/2 INCB018424 no lo hicieron. Sin estar obligados por la teoría, se espera que los inhibidores de JAK1/2 anulen las consecuencias inflamatorias posteriores de las citoquinas efectoras derivadas de células T (IFN-γ, IL-17) en el tejido diana.

Firmas inmunitarias "proteómicas" en suero: Las citoquinas y las quimioquinas en suero son un reflejo del medio inflamatorio en el órgano diana. Los datos en humanos demuestran elevaciones de varias citoquinas y quimioquinas, algunas de las cuales se correlacionan con la actividad de la enfermedad (por ejemplo, IL-8), ampliando las observaciones de estudios previos (106, 107, 109). De acuerdo con nuestros hallazgos generales que implican IL-15 e IFN-γ en la patogénesis de AA, se observa que IFN-γ y la conocida quimioquina inducible por IFN-γ IP-10 (CXCL10) están reguladas al alza en sueros de AA humanos. Los biomarcadores inflamatorios de citoquinas/quimioquinas funcionalmente relevantes se identificarán en los sueros de ratones con AA utilizando una metodología multianalítica (plataforma Luminex). La ventaja del desarrollo de biomarcadores en el ratón, además de la homogeneidad genética, es la relativa facilidad de los estudios longitudinales para identificar biomarcadores que ocurren temprano o tarde en la progresión de la enfermedad y, por el contrario, con la respuesta al tratamiento. A nivel de ARN, los microarreglos de IFN de piel de ratón C3H demostraron que tanto los IFN de tipo I (IFNα₁₋₃, ε) como el IFN de tipo II (IFN-γ) también estaban regulados positivamente por varias quimioquinas asociadas a IFN (CXCL9-11, CCL5). La producción de citoquinas/quimioquinas se examinará en sueros utilizando el ensayo Luminex multianalítico personalizado (I+D), abordando exhaustivamente los niveles séricos de 9 quimioquinas (CCL2-5, CCL11, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11) y 14 citoquinas (IFNα, IFNγ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF, GM-CSF). Se incluyen pares de anticuerpos para detectar niveles séricos de NKG2DLs (117) e IL-15Rα.

Perfil transcripcional de la piel: En la AA humana, estudios publicados de pequeñas series de pacientes han observado una respuesta de IFN Tipo I en biopsias de lesiones (105) y sesgo Th1 y citoquinas/quimioquinas con respuesta de IFN elevada en la sangre periférica (106- 110) y revisado en (111). Estos datos se reflejan en el análisis del ratón C3H. El perfil transcripcional de ARN aislado de piel de ratón alopecica reveló una respuesta de IFN dominante. 18 de los 21 principales genes regulados al alza en la piel con AA eran genes de respuesta IFN, lo que se confirmó por PCR en tiempo real (Figura 22). La regulación al alza de los genes de respuesta a IFN CXCL9-11 es notable ya que las células CD8⁺NKG2D⁺ también expresan uniformemente su receptor de quimioquinas compartido, CXCR3, un receptor regulado al alza en efectores inmunes de corta duración (118-120). Estas quimioquinas también están reguladas al alza en los sueros de sujetos con AA humanas y, por lo tanto, pueden ser un biomarcador cutáneo AA funcionalmente relevante en la piel (ARNm) y en la sangre (proteína). El trabajo en esta área continuará, construyendo una base de datos de firmas de ARN de la piel recolectadas antes y durante el tratamiento en curso, que puede usarse para adaptar los planes de tratamiento y como indicadores tempranos de la respuesta al tratamiento. Para alcanzar estos objetivos, se realizarán estudios paralelos en el ratón con esteroides intralesión y CTLA4-Ig, así como con intervenciones terapéuticas, para proporcionar una base de datos de perfil transcripcional que será útil para hacer referencias cruzadas de los estudios de tratamiento humano (análisis genómico comparativo entre estudios y para el posible desarrollo clínico de metodologías más novedosas).

Sujetos humanos

Se tomarán biopsias de piel del cuero cabelludo de un mínimo de 100 pacientes con alopecia areata y aproximadamente 100 controles. La población de sujetos consistirá en pacientes con AA y sujetos de control no afectados que recibirán un trasplante de cabello. La aprobación para la recolección de estas muestras se sometió a

una revisión/exención acelerada, ya que se descartan tejidos. Se está preparando un protocolo para la recolección de biopsias del cuero cabelludo de pacientes con AA. Se reclutará un mínimo de 100 sujetos con AA, pero la recolección de más de 100 será beneficiosa y aumentará el poder de esta metodología.

- 5 Con el fin de lograr la máxima homogeneidad entre las muestras para generar el interactoma de expresión, los folículos capilares se recolectarán exclusivamente de sujetos varones caucásicos de mediana edad con AA, ya que los donantes de control coincidentes son más comúnmente de este grupo. Por lo tanto, a pesar del hecho de que AA no muestra predilección étnica o de género, los pacientes de AA serán seleccionados para que coincidan en edad y género con los controles para el propósito de este estudio (varones caucásicos de mediana edad). Los pacientes con enfermedad activa (es decir, con algunos folículos pilosos restantes) también serán seleccionados para que puedan ser microdisecados eficientemente.

Animales vertebrados

- 15 Se adquirirán ratones Jackson C3H/HeJ (2-3 meses) y cruces retirados que muestren pérdida de cabello visible de Jackson Labs. Los animales se mantendrán en condiciones estándar en las instalaciones para animales.

A los ratones se les administrarán fármacos o anticuerpos mediante inyecciones sistémicas o tópicamente. Para aplicaciones tópicas, la piel del ratón se afeitará en la superficie dorsal con un cortador eléctrico. Una semana después del afeitado, los ratones recibirán una aplicación tópica de los químicos disueltos en acetona o 10% v/v en propilenglicol como vehículos. Las inyecciones se administrarán por vía intraperitoneal o subcutánea. La dosificación y la frecuencia de administración se seguirán según los protocolos establecidos. Los ratones serán monitorizados diariamente para detectar signos de angustia durante la duración del tratamiento.

25 Referencias

1. NIH Biennial Report of the Director, National Institutes of Health Fiscal Years 2006 & 2007, Summary of Activities by Disease Category, Autoimmune Diseases. (2007).
2. Tobias, L. A Briefing Report on Autoimmune Diseases and AARDA: Past, Present, and Future, (2010).
3. Safavi, K.H., Muller, S.A., Suman, V.J., Moshell, A.N. & Melton, L.J., 3rd Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clin Proc* 70, 628-633 (1995).
4. Wasserman, D., Guzman-Sanchez, D.A., Scott, K. & McMichael, A. Alopecia areata. *Int J Dermatol* 46, 121-131 (2007).
5. Alkhalifah, A., Alsantali, A., Wang, E., McElwee, K.J. & Shapiro, J. Alopecia areata update: part II. Treatment. *J Am Acad Dermatol* 62, 191-202, quiz 203-194.
6. Alkhalifah, A., Alsantali, A., Wang, E., McElwee, K.J. & Shapiro, J. Alopecia areata update: part I. Clinical picture, histopathology, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 62, 177-188, quiz 189-190.
7. Delamere, F.M., Sladden, M.M., Dobbins, H.M. & Leonardi-Bee, J. Interventions for alopecia areata. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004413 (2008).
8. Kaelin, U., Hassan, A.S., Braathen, L.R. & Yawalkar, N. Treatment of alopecia areata partim universalis with efalizumab. *J Am Acad Dermatol* 55, 529-532 (2006).
9. Strober, B.E. et al. Alefacept for severe alopecia areata: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Dermatol* 145, 1262-1266 (2009).
10. Petukhova, L. et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature* 466, 113-117 (2010).
11. Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B. & Jabri, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29, 493-525 (2011).
12. Champsaur, M. & Lanier, L.L. Effect of NKG2D ligand expression on host respuesta inmunes. *Immunol Rev* 235, 267-285 (2010).
13. Van Belle, T.L. & von Herrath, M.G. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol Immunol* 47, 8-11 (2009).
14. Caillat-Zucman, S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 67, 204-207 (2006).

15. Paus, R., Ito, N., Takigawa, M. & Ito, T. The hair follicle and immune privilege. *J Invest Dermatol Symp Proc* 8, 188-194 (2003).
16. Paus, R., Nickoloff, B.J. & Ito, T. A 'hairy' privilege. *Trends Immunol* 26, 32-40 (2005).
17. Paus, R., Slominski, A. & Czarnecki, B.M. Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I expression in the anagen hair bulb? *Yale J Biol Med* 66, 541-554 (1993).
18. Gilhar, A., Paus, R. & Kalish, R.S. Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata. *J Clin Invest* 117, 2019-2027 (2007).
19. Ito, T. et al. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am J Pathol* 164, 623-634 (2004).
20. Ito, T. et al. Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. *J Invest Dermatol* 128, 1196-1206 (2008).
21. Ito, T., Meyer, K.C., Ito, N. & Paus, R. Immune privilege and the skin. *Curr Dir Autoimmun* 10, 27-52 (2008).
22. Sundberg, J.P., Boggess, D., Montagutelli, X., Hogan, M.E. & King, L.E., Jr. C3H/HeJ mouse model for alopecia areata. *J Invest Dermatol* 104, 16S-17S (1995).
23. Sundberg, J.P., Oliver, R.F., McElwee, K.J. & King, L.E., Jr. Alopecia areata in humans and other mammalian species. *J Invest Dermatol* 104, 32S-33S (1995).
24. McElwee, K.J. et al. Transfer of CD8(+) cells induces localized hair loss whereas CD4(+)/CD25(-) cells promote systemic alopecia areata and CD4(+)/CD25(+) cells blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. *J Invest Dermatol* 124, 947-957 (2005).
25. Gilhar, A. et al. Transfer of alopecia areata in the human scalp graft/Prkdc(scid) (SCID) mouse system is characterized by a TH1 response. *Clin Immunol* 106, 181-187 (2003).
26. Van Belle, T.L. & von Herrath, M.G. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Molecular Immunology* 47, 8-11 (2009).
29. Sun, J., Silva, K.A., McElwee, K.J., King, L.E., Jr. & Sundberg, J.P. The C3H/HeJ mouse and DEBR rat models for alopecia areata: review of preclinical drug screening approaches and results. *Exp Dermatol* 17, 793-805 (2008).
30. Sundberg, J.P., Cordy, W.R. & King, L.E., Jr. Alopecia areata in aging C3H/HeJ mice. *J Invest Dermatol* 102, 847-856 (1994).
31. Sundberg, J.P., Cordy, W.R. & King, L.E. Alopecia areata in aging C3H/HeJ mice. *J Invest Dermatol* 102, 847-856 (1994).
32. McElwee, K., Boggess, D., Miller, J., King, L. & Sundberg, J. Spontaneous alopecia areata-like hair loss in one congenic and seven inbred laboratory mouse strains. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4, 202-206 (1999).
33. Sun, J., Silva, K.A., McElwee, K.J., King, L.E. & Sundberg, J.P. The C3H/HeJ mouse and DEBR rat models for alopecia areata: preclinical drug screening tools *Exp Dermatol* 17, 793-805 (2008).
34. Sundberg, J.P., Silva, K.A., McPhee, C. & King, L.E. Skin diseases in laboratory mice: approaches to drug target identification and efficacy screening. *Methods Mol Biol* 602, 193-213 (2010).
35. Sundberg, B.A., Schofield, P.N., Gruenberger, M. & Sundberg, J.P. A data capture tool for mouse pathology phenotyping. *Vet Pathol* 46, 1230-1240 (2009).
36. Sundberg, J.P., Sundberg, B.A. & Schofield, P.N. Integrating mouse anatomy and pathology ontologies into a diagnostic/phenotyping database: tools for record keeping and teaching. *Mammalian Genome* 19, 413-419 (2008).
74. Dandekar, A.A., O'Malley, K. & Perlman, S. Important roles for gamma interferon and NKG2D in gammadelta T-cell-induced demyelination in T-cell receptor beta-deficient mice infected with a coronavirus. *J Virol* 79, 9388-9396 (2005).
78. Fridman, J.S. et al. Preclinical evaluation of local JAK1 and JAK2 inhibition in cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 131, 1838-1844 (2011).

81. Karaman, M.W. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 26, 127-132 (2008).
89. Freyschmidt-Paul, P. et al. Interferon-gamma-deficient mice are resistant to the development of alopecia areata. *Br J Dermatol* 155, 515-521 (2006).
90. Hirota, R. et al. Induction of hair regrowth in the alopecia site of IFN-gamma knockout mice by allografting and IFN-gamma injection into the transplantation site. *J Interferon Cytokine Res* 23, 433-439 (2003).
91. Gilhar, A., Kam, Y., Assy, B. & Kalish, R.S. Alopecia areata induced in C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege. *J Invest Dermatol* 124, 288-289 (2005).
92. Skurkovich, S., Korotky, N.G., Sharova, N.M. & Skurkovich, B. Treatment of alopecia areata with anti-interferon-gamma antibodies. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10, 283-284 (2005).
93. Nakamura, M., Jo, J., Tabata, Y. & Ishikawa, O. Controlled delivery of T-box21 small interfering RNA ameliorates autoimmune alopecia (Alopecia Areata) in a C3H/HeJ mouse model. *Am J Pathol* 172, 650-658 (2008).
94. Mistry, N., Shapero, J. & Crawford, R.I. A review of adverse cutaneous drug reactions resulting from the use of interferon and ribavirin. *Can J Gastroenterol* 23, 677-683 (2009).
95. Maticic, M., Poljak, M., Lunder, T., Renner-Sitar, K. & Stojanovic, L. Lichen planus and other cutaneous manifestations in chronic hepatitis C: pre- and post-interferon-based treatment prevalence vary in a cohort of patients from low hepatitis C virus endemic area. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22, 779-788 (2008).
96. Kartal, E.D., Alpat, S.N., Ozgunes, I. & Usluer, G. Adverse effects of high-dose interferon-alpha-2a treatment for chronic hepatitis B. *Adv Ther* 24, 963-971 (2007).
97. Kartal, E.D., Alpat, S.N., Ozgunes, I. & Usluer, G. Reversible alopecia universalis secondary to PEG-interferon alpha-2b and ribavirin combination therapy in a patient with chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19, 817-820 (2007).
98. Demirturk, N., Aykin, N., Demirdal, T. & Cevik, F. Alopecia universalis: a rare side effect seen on chronic hepatitis C treatment with peg-IFN and ribavirin. *Eur J Dermatol* 16, 579-580 (2006).
99. Yu, M.L. et al. A randomised study of peginterferon and ribavirin for 16 versus 24 weeks in patients with genotype 2 chronic hepatitis C. *Gut* 56, 553-559 (2007).
100. Taliani, G. et al. Reversible alopecia universalis during treatment with PEG-interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *J Chemother* 17, 212-214 (2005).
101. Radny, P. et al. Alopecia areata induced by adjuvant treatment with alpha-interferon in malignant melanoma? *Dermatology* 209, 249-250 (2004).
102. Agesta, N., Zabala, R. & Diaz-Perez, J.L. Alopecia areata during interferon alpha-2b/ribavirin therapy. *Dermatology* 205, 300-301 (2002).
103. Kernland, K.H. & Hunziker, T. Alopecia areata induced by interferon alpha? *Dermatology* 198, 418-419 (1999).
104. Lang, A.M., Norland, A.M., Schuneman, R.L. & Tope, W.D. Localized interferon alfa-2b-induced alopecia. *Arch Dermatol* 135, 1126-1128 (1999).
105. Ghoreishi, M., Martinka, M. & Dutz, J.P. Type 1 interferon signature in the scalp lesions of alopecia areata. *Br J Dermatol*.
106. Barahmani, N. et al. Serum T helper 1 cytokine levels are greater in patients with alopecia areata regardless of severity or atopy. *Clin Exp Dermatol* (2009).
107. Kuwano, Y. et al. Serum chemokine profiles in patients with alopecia areata. *Br J Dermatol* 157, 466-473 (2007).
108. Arca, E., Musabak, U., Akar, A., Erbil, A.H. & Tastan, H.B. Interferon-gamma in alopecia areata. *Eur J Dermatol* 14, 33-36 (2004).
109. Benoit, S., Toksoy, A., Goebeler, M. & Gillitzer, R. Selective expression of chemokine monokine induced by interferon-gamma in alopecia areata. *J Invest Dermatol* 121, 933-935 (2003).

110. Hoffmann, R. et al. Cytokine mRNA levels in Alopecia areata before and after treatment with the contact allergen diphenylcyclopropenone. *J Invest Dermatol* 103, 530-533 (1994).

111. Gregoriou, S. et al. Cytokines and other mediators in alopecia areata. *Mediators Inflamm* 2010, 928030.

112. Clark, R.A. et al. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176, 4431-4439 (2006).

113. Clark, R.A. et al. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol* 126, 1059-1070 (2006).

114. Bissonnette, R. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase I study of MEDI-545, an anti-interferon-alfa monoclonal antibody, in subjects with chronic psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 62, 427-436.

115. Hommes, D.W. et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 55, 1131-1137 (2006).

116. Verstovsek, S. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 363, 1117-1127 (2010).

117. Nuckel, H. et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 24, 1152-1159 (2010).

118. Hu, J.K., Kagari, T., Clingan, J.M. & Matloubian, M. Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E118-127.

119. Kohlmeier, J.E. et al. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. *J Exp Med* 208, 1621-1634.

120. Kurachi, M. et al. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *J Exp Med* 208, 1605-1620.

125. Ramsborg, C.G. & Papoutsakis, E.T. Global transcriptional analysis delineates the differential inflammatory response interleukin-15 elicits from cultured human T cells. *Exp Hematol* 35, 454-464 (2007).

126. Chiossone, L. et al. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2-versus IL-15-activated NK cells. *Blood* 109, 3767-3775 (2007).

127. Creed, T.J. et al. The effects of cytokines on suppression of lymphocyte proliferation by dexamethasone. *J Immunol* 183, 164-171 (2009).

128. Goleva, E., Kisich, K.O. & Leung, D.Y. A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance. *J Immunol* 169, 5934-5940 (2002).

129. Rentzos, M. et al. Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in MS patients: effect of treatment with methylprednisolone in patients with relapse. *Neurol Res* 32, 684-689 (2009).

130. Tliba, O. et al. Cytokines induce an early steroid resistance in airway smooth muscle cells: novel role of interferon regulatory factor-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 463-472 (2008).

131. Xu, Q., Goleva, E., Ou, L.S., Li, L.B. & Leung, D.Y. CD56⁺ cells induce steroid resistance in B cells exposed to IL-15. *J Immunol* 172, 7110-7115 (2004).

Ejemplo de referencia 5

Se identificaron células T efectoras alopécicas en el ganglio linfático y en la sangre de ratones alopécicos usando especificación de células clasificadas por flujo. Se desarrolló un ensayo a base de sangre para controlar estas células T alopécicas durante el tratamiento. Se han desarrollado ensayos citotóxicos para evaluar componentes funcionales de las interacciones del folículo piloso (HF) con CTL, tanto en humanos como en ratones.

Utilizando muestras biológicas humanas obtenidas de sujetos con AA, se demostró que las células T circulantes expresan altos niveles de NKG2D y las células T primarias obtenidas de la piel están dominadas por células productoras de CD8⁺NKG2D⁺ IFN- γ que establecen paralelos entre el ratón y la enfermedad humana.

Inmunofenotipificación e inmunobiología de la piel.

Para estudiar las rutas en bioespecificaciones se requiere el análisis de poblaciones celulares heterogéneas en la piel y en la sangre. En la investigación clínica de la autoinmunidad humana, la alopecia areata ofrece una oportunidad única debido a la accesibilidad del estudio que permite el órgano final/aislamiento de los efectores inmunes patógenos en su microambiente relevante. Se proporcionarán las herramientas analíticas y el personal necesarios para el estudio óptimo de estas preciosas bioespecies de piel de órganos terminales y sus contrapartes celulares/serológicas en la sangre obtenida del mismo individuo.

Preparación y análisis de bioespecímenes:

Se proporcionará lo siguiente para ayudar en el análisis de sangre:

i) Análisis de cianoquinas/quimioquinas multianálisis a partir de muestras de suero.

ii) Inmunofenotipificación citométrico de flujo, incluido el análisis de citoquinas de PBMC humanas de sujetos con AA.

iii) Clasificación de flujo para aplicaciones posteriores utilizando subconjuntos de células T (perfil de ARN, especificación de espectros).

Se proporcionará lo siguiente para ayudar en el análisis de la piel:

i) Preparación/análisis de fracciones celulares viables tanto del folículo piloso primario como de los componentes de las células T para estudios funcionales (citotoxicidad) y analíticos (clonación de células T, espectrotipificación).

ii) Inmunotinción y transcripción de perfiles de piel completa

iii) Inmunofenotipificación citométrico de flujo de linfocitos dérmicos de piel con AA humana y de ratón.

Experimentos científicos

a. Se identificarán subconjuntos celulares patógenos específicos de HF en la sangre periférica de sujetos con AA. Con este fin, el análisis de tipo de espectro se utilizará como una herramienta para identificar las poblaciones de células T alopecicas humanas circulantes, como se hizo para el modelo de ratón, al hacer coincidir el tipo de espectro encontrado en las células T de piel total con los tipos de espectros de subconjuntos de células T de sangre periférica específicos clasificados en la sangre periférica obtenida de los mismos pacientes.

b. Se establecerá el predominio de Th1 en AA humana y se desarrollará la lógica y la plataforma de biomarcadores para las terapias dirigidas a Th1. La focalización terapéutica de las vías Th específicas de la enfermedad ha tenido éxito en otras enfermedades inflamatorias de la piel humana, especialmente en la psoriasis, una enfermedad Th17 prototípica. Hay datos sustanciales en el modelo animal de AA para AA como enfermedad Th1 predominante. El perfil Th de las células T AA dérmicas infiltrantes y los subconjuntos de células T circulantes relevantes en la sangre se abordarán mediante una metodología de múltiples puntas, que incluye análisis de citología multianálisis, ARN, inmunotinción y flujo intracelular de la piel y la sangre.

Una metodología integradora para la investigación traslacional comienza con estudios básicos que identifican rutas dirigibles en AA, luego prueba estas rutas terapéuticamente en modelos preclínicos, evaluación de biomarcadores longitudinales en ensayos clínicos y búsqueda de investigación basada en la población basada en estudios genéticos. Los efectos terapéuticos preclínicos de las intervenciones se evaluarán en los modelos de ratón con AA injertados, se evaluarán los efectos del tratamiento sobre las respuestas inflamatorias en la piel y la sangre, y se proporcionarán bioespecies humanas para la validación de la relevancia humana en estudios ex vivo.

La monitorización de las interacciones patogénicas entre las células inmunes y las células diana en la piel en humanos requiere un procesamiento y análisis sofisticado de tejidos y sangre humanos primarios.

La citometría de flujo se ha convertido en la herramienta principal para la identificación de poblaciones celulares de acuerdo con parámetros específicos y, por lo tanto, es empleada por un número cada vez mayor de científicos biomédicos.

La inmunobiología de la piel presenta características y desafíos específicos; La arquitectura especial del tejido, incluidas sus funciones de barrera, sus poblaciones de células inmunes únicas asociadas y su proximidad/interacción cercana con la flora microbiana, y las dificultades prácticas de aislar linfocitos infiltrantes, son parte de las complejidades necesarias para ser entendidas en el enfoque de enfermedades inmunológicas de la piel. Se encuentran disponibles servicios que brindan asistencia con el procesamiento y tinción de tejidos, así como el aislamiento celular, y esenciales para asegurar resultados consistentes de alta calidad.

La citometría de flujo es una herramienta para investigadores clínicos y se requiere un conocimiento práctico de su uso para todos los inmunólogos traslacionales. Están disponibles cuatro citómetros de flujo, que incluyen dos

instrumentos de caballo de batalla (FAC Canto y FAC Calibre), un LSR II de 6 láser y un BD Influx de 4 láser. El LSR II y BD Influx han sido diseñados para tener láseres/detectores comparables para facilitar la transición del análisis a la clasificación preparativa. El LSR II está equipado con 6 láseres, capaces de detectar en total 19 colores simultáneamente, proporcionando versatilidad para detectar proteínas fluorescentes (mBanana, GFP, BFP, RFP/dsRed, mCherry mRaspberry) y tintes fluorescentes/fluorocromos químicos. LSR II puede analizar diversos tipos de células dentro de poblaciones de células heterogéneas a partir de tejidos utilizando una amplia gama de fluorocromos orgánicos e inorgánicos. Estos parámetros fluorescentes adicionales permiten la detección de eventos funcionales coordinados en tipos de células específicos en poblaciones mixtas (por ejemplo, IFN-gamma intracelular, producción de IL-10 y detección de fosfoproteína en poblaciones de células T de tejidos cutáneos y ganglios linfáticos drenantes). El instrumento básico LSR II está equipado con tres láseres; azul (488 nm), rojo (633 nm), violeta (405 nm). El LSR II de diseño personalizado contiene, además, tres láseres adicionales que permiten la detección de hasta 20 colores y un lector de placas de 96 pozos. Los diseños de panel de 10 colores "dejar uno afuera" para subconjuntos de células T (por ejemplo, Tregs), células B y monocitos se han diseñado para aprovechar el láser 594 amarillo verdoso 100W que tiene una sensibilidad exquisita para Alexa 594 "roja". Por lo tanto, los investigadores pueden adoptar un diseño de "dejar uno afuera" para examinar con sensibilidad la expresión de un marcador de interés específico mediante tinción con anticuerpos conjugados con Alexa 594.

Calidad: Se realizará un desarrollo de panel para inmunofenotipificar poblaciones de linfocitos en sangre periférica humana y otros experimentos. Debido a la capacidad del sistema de 6 láser del LSR II, se estableció un conjunto común de colores "fáciles de usar" que se pueden usar sin necesidad de compensación. La capacidad de hacer un experimento de 5/6 colores sin la necesidad de compensación fluorescente brinda una mayor resolución de datos ya que los fluorocromos están tan separados entre sí en el espectro y son excitados independientemente por cada línea de láser. Esto permite que las poblaciones se separen claramente, algo que es raro cuando se aplica una compensación. La combinación actual de fluorocromo seleccionada es DAPI (activada en las células negativas DAPI) Pacific Blue, FITC, PE, Alexa Fluor 594 y APC, sin embargo, actualmente se están probando y utilizando otras combinaciones de fluoruros. Este conjunto de 5 fluorocromos sirve como plataforma base para paneles, a los que se pueden agregar fluorocromos adicionales. En un experimento de prueba de concepto, el uso de 5 fluorocromos se mostró simultáneamente sin necesidad de compensación. Los esplenocitos C57BL/6 se tiñeron con CD8 Pacific Blue, CD3 FITC, CD45R (B220) PE, CD11b Bio+Estreptavidina Alexa Fluor 594 y CD4 APC.

Mantenimiento y control de calidad para inmunobiología de la piel: El procedimiento utilizado para el aislamiento de linfocitos de biopsias de piel se ha adaptado de un método desarrollado por Clark y Kupper (2) en el que las biopsias son cultivo en matrices de espuma de celulosa recubiertas de tantalo tridimensionales para promover la migración de células T de las biopsias. De cada población de células aisladas, se utilizará una fracción menor para la tinción de CD45/CD3 para evaluar el número de leucocitos/linfocitos T por citometría de flujo antes de estudios adicionales o criopreservación. Para su reutilización, las matrices se remojarán durante 30 minutos en lejía al 10%, luego se enjuagarán en agua y se transferirán a una solución de limpiador enzimático Enzyte (Decon Labs). Las matrices se dejarán en esta solución en una placa caliente con agitador durante 24 horas, se enjuagarán con agua destilada y se dejarán secar antes de esterilizarlas en autoclave.

Se proporcionarán técnicas analíticas de piel completa (por ejemplo, inmunotinción). Se proporcionará lo siguiente: 1) experiencia crítica en inmunobiología de la piel para la preparación/análisis de fracciones celulares viables tanto de los folículos pilosos primarios como de las células T cutáneas; 2) capacidades de desarrollo de biomarcadores para bioespecíficos clínicos, incluido el análisis multianalítico (Luminex) y el perfil transcripcional de bioespecíficos clínicos preciosos (piel y sangre de sujetos inscritos en ensayos clínicos). Se proporcionarán las herramientas para investigar procesos biológicos y monitorizar los mecanismos inflamatorios de AA en muestras preclínicas y clínicas tanto de la sangre como del órgano final diana de AA. <http://www.c2b2.columbia.edu/page.php?pageid=10>

Las capacidades en el análisis y almacenamiento de datos de microarreglos, análisis de secuencias y rutas están disponibles para los estudios en este documento, y se extienden hasta los algoritmos más recientes para la ingeniería inversa de redes reguladoras. Se crean y mantienen varias bases de datos ampliamente utilizadas. Además, todas las bases de datos importantes de secuencia y estructura se mantienen centralmente. Esto permite búsquedas directas a gran escala, si es necesario, utilizando algoritmos personalizados y computación en clúster. Muchos de los métodos de investigación desarrollados se agrupan en aplicaciones de software y servicios computacionales, disponibles gratuitamente para la comunidad científica (<http://www.c2b2.columbia.edu/page.php?pageid=10>).

Los siguientes servicios están disponibles:

1. Inmunomonitorización:

a. Análisis de citoquinas y quimioquinas de multianálitos a partir de muestras de suero

Hay dos metodologías disponibles: a) Los sistemas de inmunoensayos basados en microesferas múltiples (por ejemplo, CBA/FlowCytomix) proporcionan múltiples analitos que permiten evaluar 10 o más citoquinas/quimioquinas en una sola lectura de una muestra de pequeño volumen (50 µl). La capacidad de alto rendimiento del pozo 96 LSR II proporciona facilidad de uso combinada con eficiencia. El software (compuerta "a presión") está disponible

internamente para el análisis de datos. También se desarrollará un sistema de ensayo basado en perlas multiplex para cuantificar NKG2DL humano y murino soluble en el suero, para el cual se encuentran disponibles en el mercado conjuntos de anticuerpos específicos. b) El análisis multiplex utilizando la plataforma Luminex está disponible en el CTSA para el análisis de matrices de citoquinas y quimioquinas de ratones y humanos disponibles comercialmente (Figura 24). Los ensayos Luminex se proporcionan por tarifa de servicio, con reactivos adquiridos por el usuario. Una vez que una plataforma de biomarcadores de suero AA, la compra a granel de analitos seleccionados permitirá un ahorro de costos.

Inmunofenotipificación citométrico de flujo

Se ha establecido usando flujo multiparamétrico que las células CD8⁺NKG2D⁺ dominan la población de leucocitos dérmicos recolectados de la piel de ratones con alopecia espontánea (Figura 25). Para abordar la situación humana, se han desarrollado paneles de flujo para definir alteraciones cuantitativas en cualquiera de los 30 subconjuntos de PBMC centrados en las poblaciones de células T NK y CD4 y CD8 utilizando 3 tubos FACS (tubo de subconjunto de células T, tubo marcador NK para CD4, CD8 y células NK y un tercer tubo de células no T); Marcadores de linaje: CD3, CD4, CD8α, CD8β, CD14, CD19, CD20, CD56, CD64; Marcadores del subconjunto de células T: CD45Ra, CD45Ro, CD56, CD62L, CCR7, CD127, FoxP3, Helio; Análisis del receptor de quimioquinas cutáneas: CCR4, CCR8, CCR10, CLA, E y P-selectina; miembros de la familia de inmunorreceptores NK: inhibidor: KIR/CD158, CD94/NKG2A, LILR/ILT, LAIR1 NKR-P1 activador: NKp46, NKp30, NKp44, NKG2C, NKG2D. En la evaluación inicial de las PBMC de cuatro sujetos con AA, se observó un aumento de la expresión de NKG2D en las células T CD56⁺ CD8⁺ y las células NK, pero no en las células T CD4⁺ (Figura 26).

Análisis de citoquinas: La activación de células T periféricas de la capa leucocitaria recién aisladas con PMA/ionomicina impulsará la producción de citoquinas por las células T de memoria circulante. Después de 4 horas de incubación con brefeldina, las células se tiñen con marcadores de superficie celular, se fijan y se permeabilizan antes de la tinción intracelular para IL-2, IFN-γ, TNF, IL-4, IL-17 y FOXP3/helios. Estas citoquinas/factores de transcripción junto con los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD62L, NKG2D, CD45Ra, CD45Ro, CLA/CCR4 delinearán la fracción de Th1/Th2/Th17/Tregs en el compartimento total y cutáneo de células T CD4/CD8 ingenuas y de memoria y su expresión de NKG2D. Sin estar limitados a la teoría, utilizando un LSRII, que permite pruebas multiparamétricas desde un solo tubo, de 2 a 4 millones de PBMC serán más que suficientes para este análisis. Esto dejará suficientes PBMC (>20 millones de células) de una extracción de sangre de 30 ml para proporcionar otros objetivos.

Clasificación de flujo para aplicaciones posteriores utilizando subconjuntos de células T

El objetivo es proporcionar potenciales células T alopécicas para el análisis funcional posterior. Por ejemplo, se proporcionarán subconjuntos de células T ordenadas por flujo para el perfil de ARN, por ejemplo, el perfil transcripcional de células T de tipo NK. Para los estudios de biomarcadores, enfocarse en el subconjunto celular apropiado mejorará la resolución del análisis, que de lo contrario se diluirá por la presencia de ARN de la población mixta heterogénea de PBMC.

Los estudios en el ratón con AA indican que las células T alopécicas (Figura 24), están recirculando y se pueden encontrar y aislar fácilmente de la sangre y los ganglios linfáticos cutáneos. Se pueden aislar más de 5 millones de células T CD8⁺NKG2D⁺ mediante la clasificación por flujo de los ganglios linfáticos cutáneos de un solo ratón. Este es un número impresionante de células T "patógenas" primarias frescas para el estudio posterior y es una mejora sustancial en los rendimientos celulares que uno puede esperar recuperarse de los "arrastrés" de la piel alopécica. La identificación de subconjuntos de células T patógenas en la sangre de sujetos humanos con AA es un objetivo científico. Se proporcionarán subconjuntos de células T aislados de flujo para aplicaciones posteriores, incluidos estudios de biomarcadores, estudios funcionales y espectros para proporcionar evidencia de la relevancia inmunopatogénica de subconjuntos de células T específicos.

i) Análisis de espectrotipo del repertorio de TCR

La espectrotipificación o el análisis de distribución de longitud de cadena β de TCR o ARN de tejidos o subconjuntos de linfocitos fenotípicamente separados proporciona un retrato cualitativo de la utilización/repertorio de clonotipo de TCR de las células T infiltrantes. En los últimos años, esta técnica ha sido utilizada por otros (5-7) como un método altamente sensible y preciso para delinear la proporción de células T expandidas clonalmente en una muestra. La oligoclonalidad, evidencia de expansión de subconjuntos de células T con TCR restringidos, es indicativo de impulso antigénico en procesos inflamatorios y puede usarse como un primer paso para identificar clones de células T patógenas. Como cada reordenamiento de TCR varía en la longitud de CDR3 en múltiplos de tres nucleótidos, la heterogeneidad de la longitud de CDR3 dentro de una población de células T puede usarse como una medida de la diversidad de TCR. El principio de esta técnica es amplificar por PCR el ADNc obtenido de una población de células T usando cebadores de miembros de la familia Vβ específicos corriente arriba y un cebador de región constante corriente abajo que abarcan juntos la región CDR3 hecha por unión VDJ combinatoria y de unión. Los productos de PCR se marcan con fluorocromo en una reacción de extensión de cebador ("escurrimiento") usando un cebador de región constante marcado con fluorescencia. Los productos se ejecutan en el analizador de ADN ABI PRISM 3700.

Con el software Gene Mapper se puede visualizar y analizar el tamaño de los picos correspondientes a longitudes discretas de CDR3 (Figuras 20 y 27). Los datos se exportan y comparan con los repertorios policlonales de referencia, y se calculan medidas de oligoclonalidad como la distancia de Hamming. El área de los picos en cada histograma refleja la frecuencia de expresión de cada longitud de CDR3 dentro de cada familia. Un predominio de expansiones clonales en la piel indica un papel principal para los antígenos dérmicos en la conducción de enfermedades y permitirá la investigación enfocada de las células T patógenas. Por el contrario, un repertorio policlonal de clones no expandidos indicará el reclutamiento por receptores de quimioquinas no clonalmente específicos. Las comparaciones del repertorio de TCR en la piel sin lesiones y en la sangre de los mismos individuos indicarán si las poblaciones de células T residentes en la piel expandidas clonalmente también pueden encontrarse en la circulación. De manera similar, se pueden utilizar subconjuntos de células T para el material fuente de ARN para el análisis del repertorio. Por ejemplo, las Figuras 20 y 27 demuestran que en ratones C3H se encuentra una población oligoclonal en la piel de la lesión, un repertorio que también está sobrerrepresentado en poblaciones de ganglios linfáticos CD8 positivos, pero no negativos para NKG2D. Estos datos confirman que las células T CD8+NKG2D+ contienen la mayoría (pero no todas) de las poblaciones de células T oligoclonales que se encuentran en la piel. Nótese que algunos TCR/clones se encuentran en la piel, pero no en el drenaje de los ganglios linfáticos cutáneos, por ejemplo, Vβ10. Estos probablemente incluyen poblaciones de células T CD4+ que se encuentran en la piel con AA pero que no están presentes en la fracción CD8+ LN clasificada. Esta metodología proporciona evidencia poderosa de "impulso de antígeno", y combinado con la clasificación de flujo como se muestra aquí, identifica subconjuntos de células T patógenas entre poblaciones de células.

Esta evidencia de compartición clonal u oligoclonalidad será investigada y validada en muestras de ratones y humanos a nivel de resolución de clonotipo mediante la preparación de bibliotecas bacterianas de los productos de PCR usando clonación basada en topoisomerasa, y secuenciando la cadena β de TCR de los clones resultantes de una manera de alto rendimiento utilizando técnicas basadas en 96 pozos como se describe (5-7). Por lo general, se seleccionan 48 o 96 clones y se secuencian para cada producto de PCR. Las secuencias se exportan y alinean en Geneious y la estructura fina del uso y unión de elementos VDJ se determina usando Vquest. Esto permite la identificación definitiva de clones compartidos y el tráfico de linfocitos en diferentes regiones, así como la enumeración precisa de la composición clonotípica de una muestra. Además, los TCR clonotípicos se pueden usar para estudios de transducción génica para generar células T y ratones retrogénicos que expresan TCR alopécicos. Este esfuerzo también puede conducir al desarrollo de modelos TCR transgénicos "humanizados" de alopecia utilizando TCR alopécicos humanos expresados transgénicamente en ratones transgénicos HLA02.

ii) Biomarcadores de transcripción de células inmunes circulantes

Una firma transcripcional que marca lupus agresivo, resistente al fármaco, puede identificarse dentro del compartimento de células T CD8, pero no cuando se usa ARN de PBMC totales (8). De este modo, combinar la clasificación de flujo con el perfil transcripcional potencia enormemente la capacidad analítica. En la alopecia areata, el subconjunto celular patogénico en el parece ser células T CD8+NKG2Dhi que envuelven el folículo piloso y puede ser de relevancia patógena en términos generales en autoinmunidad (9) incluyendo ambas enfermedades celíacas (4, 10), diabetes tipo I (11) y artritis reumatoide (12-14). El perfil transcripcional de estas células en la enfermedad celíaca (4, 10) describió previamente una programación transcripcional de tipo NK de estas células que se evaluará de manera similar en células T CD8 circulantes purificadas y derivadas de la piel. Será importante abordar específicamente los perfiles de transcripción de estas poblaciones celulares para identificar las vías biológicas centrales de estas células.

Se identificaron genes autoinmunes regulados epigenéticamente usando metodologías genómicas basadas en Illumina y se obtuvo ADN de células T humanas autoinmunes clasificadas de pacientes con diabetes tipo I, alopecia areata y enfermedad celíaca. Se identificó la hipermetilación de las regiones promotoras que regulan negativamente la expresión de genes inmunorreguladores importantes, incluidos CD3, PD-1 y FasL.

iii) Inmunología celular

El análisis por citometría de flujo de las PBMC activadas se puede usar para el análisis de citoquinas intracelulares y/o la señalización de la activación de proteínas fosforiladas. Las respuestas clásicas de linfocitos específicos de antígeno, mitogénicos o mixtos se pueden apreciar con células T teñidas con CFSE o con incorporación de timidina. El equipo disponible incluye un recolector de células y un lector de placas Microbeta/Trilux (para ensayos de citotoxicidad de proliferación y liberación de cromo a base de timidina), lectores/lavadores de placas ELISA, lectores ELISPOT.

Inmunobiología de la piel

Preparación de folículo piloso primario y componentes de células T para estudios funcionales (citotoxicidad), preparativos (clonación de células T) y analíticos (espectros de especificación, perfiles de ARN). Las muestras de biopsia de pacientes con AA en estudio son preciosas, y los estudios de inmunotinción y perfiles de transcripción tienen la máxima prioridad dada la viabilidad y el poder informativo de estas dos metodologías. La piel del cuero cabelludo humano de rutina se obtiene de individuos de control (donantes de trasplante capilar) para establecer cultivos primarios de poblaciones celulares individuales dentro de la piel y el folículo piloso.

a) Cultivo de células T y componentes del folículo piloso, cultivo de órganos del folículo piloso y cultivo de órganos de la piel.

i) Objetivos de IC: Se utilizará piel del cuero cabelludo humano obtenida de individuos de control o afectados por AA para establecer cultivos primarios de poblaciones celulares individuales dentro de la piel y el folículo piloso (Figura 28) para estudiar la regulación de NKG2DL en poblaciones de IC primaria y evaluar poblaciones de IC como objetivos en ensayos de CTL. La piel interfolicular se tratará de manera dispar para separar los componentes epidérmico y dérmico y se procesará enzimáticamente para establecer cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos. Los folículos pilosos se microdisseccionarán para separar los componentes mesenquimatosos y se utilizarán para cultivar células de la vaina dérmica (DSC) y células de la papila dérmica (DPC). El cultivo de órganos de folículos capilares sin suero establecido en el laboratorio, modelado según los protocolos de Kondo and Philpott et al (15) (Figura 30), se utilizará para cultivar rutinariamente folículos individuales de individuos de control, así como lesiones (cuando sea posible) y controlar la piel de pacientes con AA. Los folículos se cultivan en condiciones de crecimiento sin suero y muestran un crecimiento anágeno normal durante 7-10 días, seguido de la entrada de catágenos y la desintegración de la matriz (16). Para los ensayos de citotoxicidad, los folículos se transferirán a los medios que sostienen las células T citotóxicas o las células NK (MyeloCult, Stemcell Technologies) durante 4-8 horas. Los explantes de piel mantienen una arquitectura normal de la piel, así como el microambiente inmune, y se utilizarán para estudios funcionales (17).

ii) Efectores de células T: El aislamiento de un número suficiente de células T de la piel humana digerida/dispersada enzimáticamente puede ser difícil; sin embargo, las células T cultivadas se expandieron utilizando la metodología de rastreo dérmico desarrollada por Clark (2). Los explantes de piel se han usado para expandir la población de células T residentes de la piel cultivando los explantes en matrices de espuma celular durante 3 semanas en IMDM que contiene 20% de FCS, IL-2 e IL-15. Esta técnica produce $0.3-3.0 \times 10^6$ células T por biopsia de 4 mm que permite inmunofenotipificado, clonación de células T, perfil Th y otras aplicaciones posteriores (por ejemplo, perfil transcripcional, citotoxicidad y otros ensayos funcionales). Para pacientes con AA en ensayos de intervención, si se obtienen suficientes células T después de tres semanas de expansión ($>1 \times 10^6$), se dividirán, con la mitad de la población utilizada para el aislamiento/perfil de ARN y la otra mitad utilizada para inmunofenotipificado de flujo/perfil Th. Si los rendimientos son inferiores a 1×10^6 células totales, los estudios se limitarán al perfil de ARN. Para los pacientes con AA que no están en estudio, habrá más libertad para usar células T rastreadas y objetivos de IC autólogos para estudios funcionales alternativos, que incluyen, por ejemplo, ensayos citolíticos y estudios con bloqueo de anticuerpos/moléculas pequeñas. Como ejemplo de la capacidad de analizar poblaciones clínicas raras de células T, la Figura 29 ilustra un ensayo de "rastreo" de células T, en el que la dermis humana cultivada obtenida de biopsias de piel perforada se usa como material fuente para el análisis de citometría de flujo.

Obsérvese que las células T obtenidas de biopsias de piel con AA son células T CD8+NKG2D+ que producen IFN- γ oligoclonal en contraste sorprendente con la población CD4 policlonal esperada observada en los arrastres de la piel normal (2, 18).

b.) Interacción de la piel y los componentes inmunes en los modelos de Alopecia areata

Los protocolos establecidos están disponibles para evaluar las interacciones inmunes de la piel para los estudios en este documento. Las células cultivadas primarias, así como los folículos cultivados en órganos, pueden usarse como dianas usando células T citotóxicas de control o linfocitos de sangre periférica del paciente, o los derivados de la piel (Figura 29). Las células efectoras inmunitarias se pueden cultivar conjuntamente con células diana/folículos pilosos marcados con CFSE y la citólisis se medirá colorimétricamente mediante la liberación de LDH, o alternativamente, las células muertas se teñirán con 7-AAD y los números de células se contarán por citometría de flujo. Estos ensayos se pueden usar para determinar los requisitos moleculares para la interacción de los efectores inmunes y los objetivos de IC, incluida la citotoxicidad. Por ejemplo, como se muestra aquí, la citotoxicidad requirió el compromiso de NKG2D y la sensibilización previa de los objetivos con citoquinas/ligandos TLR que se sabe que regulan al alza la transcripción de NKG2DL y la expresión superficial.

Evaluación de biomarcadores cutáneos de patogénesis: Inmunotinción y perfil transcripcional

La AA muestra una alta correlación con varios trastornos autoinmunes, lo que hace que el folículo piloso sea un órgano altamente accesible para estudiar los mecanismos básicos de autoinmunidad. Ha habido un interés sustancial en identificar marcadores biológicos sustitutos tempranos de patogénesis. Como tal, AA representa un sistema modelo para el desarrollo de biomarcadores que puede tener relevancia para una amplia gama de enfermedades. Los siguientes biomarcadores se usan actualmente para monitorizar el desarrollo de AA y la respuesta al tratamiento tanto en humanos como en ratones.

a) Tinción inmunohistoquímica para infiltración linfocítica. La AA está asociada con la presencia de infiltrado inmune intrafolicular y parafolicular. Para inmunohistoquímica, el tejido se fijará en formol al 10% en PBS durante 8 horas a temperatura ambiente y se almacenará en etanol al 70% para secciones de parafina o se incrustará directamente en Cryomatrix (Shandon, Waltham, MA) en hielo seco para secciones congeladas que se almacenan a -80°C .

Los bloques de tejido embebidos en parafina se cortan en secciones de 8 µm, y la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) se lleva a cabo para estudios histológicos. El tejido congelado también se secciona a un grosor de 8 µm y se fija en paraformaldehído al 4% para la tinción de inmunofluorescencia. Las secciones se tiñen con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia y se obtienen imágenes de inmunofluorescencia usando el microscopio Zeiss Axioskop. La tinción inmunohistológica/fluorescente básica incluirá tinción con anticuerpos primarios contra CD3, CD4, CD8. Como un ejemplo de las inmunotinción, se proporciona evidencia de que MHC I e II e ICAM-1 están reguladas de forma masiva en IC alopecicos que están asociadas con un infiltrado denso dominado por CD8 (Figura 31).

b) Aislamiento de ARN total de la piel y PCR cuantitativa para marcadores inflamatorios. Se analizará la piel humana y de ratón para determinar la elevación de las transcripciones de genes inflamatorios ya definidos, incluidos los genes de respuesta a IFN, y las firmas de genes que se definirán, incluidas las transcripciones de células T CD8 de "tipo NK". El ARN total se extraerá de la piel utilizando un kit de purificación RNeasy (Qiagen). El ARN total tratado con DNasa se transcribirá de forma inversa utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La RT-PCR se realizará utilizando SYBR Green Master Mix y un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). GAPDH y β-actina se utilizarán como genes de control de normalización interna.

Uno de los objetivos de los estudios en el presente documento es establecer el fenotipo de las poblaciones efectoras AA circulantes haciendo coincidir los tipos de subconjuntos de células T AA de sangre periférica clasificadas con las que se encuentran en las células T de la piel totales del mismo paciente. Las técnicas de clasificación por citometría de flujo se combinarán con un análisis de tipo de espectro para identificar células T patógenas en la circulación de pacientes con AA. Esta misma metodología se utilizó en el modelo de ratón para mostrar que las células de los ganglios linfáticos CD8+NKG2D+ contienen la mayoría de los clones de células T que se encuentran en la piel alopecica. En sujetos con AA, el repertorio de TCR se comparará en la piel y la sangre lesionadas y no lesionadas de los mismos individuos para identificar si las poblaciones de células T residentes en la piel expandidas clonalmente también se encuentran en la circulación. Mediante el perfeccionamiento progresivo de los criterios de clasificación para aislar el material de ARN de origen de los subconjuntos de células T circulantes, uno debería ser capaz (al menos parcialmente) de igualar el repertorio de TCR encontrado en la piel total del mismo paciente y de esta manera identificar los marcadores inmunofenotípicos de CD4 patógeno y células T CD8. La identificación de subconjuntos de células T patógenas será enormemente valiosa para monitorizar estudios clínicos, refinar el desarrollo de biomarcadores y proporcionaría materiales celulares únicos para estudios de patogénesis de cabecera a banco.

Otro objetivo de los estudios en este documento es establecer el perfil Th de las células T AA que se infiltran en la dermis y circulan en la sangre periférica. Perfil de diferenciación/citoquina de los linfocitos T AA patógenos: El direccionamiento terapéutico de vías Th específicas ha tenido éxito en otras enfermedades inflamatorias de la piel humana, especialmente en la psoriasis, una enfermedad Th17 prototípica. Hay datos sustanciales en el modelo animal de AA para AA como enfermedad Th1 predominante (19-23). Para establecer el predominio de Th1 en humanos y desarrollar la lógica y la plataforma de biomarcadores para las terapias dirigidas a Th1, se abordará el perfil Th de las células T AA cutáneas infiltrantes y los subconjuntos de células T circulantes relevantes en la sangre utilizando una metodología de múltiples puntas que incluye multianálisis, análisis de ARN, inmunotinción y análisis citométrico de flujo intracelular de la piel y la sangre. La refinación de los marcadores inmunofenotípicos para las células T AA CD4 y CD8, por supuesto, permitirá la detección de perfiles Th de las posibles células T específicas de alopecicos entre la población circulante policlonal.

Aunque el perfil transcripcional de las lesiones AA de una pequeña serie de sujetos es indicativo de sesgo de tipo Th1 (24), sin estar limitado por la teoría, la AA no es "una enfermedad". La ocurrencia común en sujetos con AA de afecciones inmunes comórbidas que reflejan un sesgo subyacente Th2 o Th1/17 que predispone a enfermedades con vías patógenas comunes incluyendo hipersensibilidad (25) (dermatitis) y otras afecciones autoinmunes (26-33) (véase estudios descritos en este documento) sugiere que puede haber un AA de tipo Th2, así como un tipo de AA Th1 o Th17. Por lo tanto, es importante identificar respuestas funcionales de células T en PBMC de la periferia y de explantes de tejido con lesiones AA de un gran número de pacientes que podrían identificar subconjuntos de AA con diferentes perfiles Th y correlacionar estos parámetros de biomarcadores de función inmune con la presencia o ausencia de los SNP relevantes.

Se evaluará el inmunofenotipo de células T de células T periféricas y células T con lesiones. Se estudiarán 50 pacientes AA y 50 controles normales del GWAS, con historia clínica adjunta. La evaluación de los perfiles Th de las células T circulantes totales es sencilla, pero se aplicará un flujo multiparamétrico a los subconjuntos de células T para una evaluación más granular, como ayuda en última instancia por la definición de marcadores inmunofenotípicos de poblaciones patogénicas AA. El aislamiento de un número suficiente de células T de la piel humana digerida/dispersada enzimáticamente puede ser difícil y puede verse alterado por las condiciones del cultivo. La correlación se realizará con perfiles de transcripción utilizando metodologías de piel completa y muestras de piel microdisecionadas para describir el perfil de citoquinas dentro del infiltrado de la vaina folicular, así como de los infiltrados en el epitelio interfolicular.

Sujetos humanos

Las biopsias de piel del cuero cabelludo se recolectarán de sujetos normales que consisten en pacientes AA y sujetos de control no afectados que reciben trasplante de cabello. Se obtendrán biopsias adicionales de sujetos en ensayos clínicos.

- 5 Las fuentes de material de investigación serán biopsias de piel del cuero cabelludo de pacientes y controles de AA. El ARN de pequeñas muestras de tejido, incluidos los compartimentos del folículo piloso microdisecionados, se obtienen de forma rutinaria. Se proporcionarán biopsias de tejido de pacientes con AA y controles.

Animales vertebrados

- 10 Se adquirirán ratones Jackson C3H/HeJ (2-3 meses) y cruces retirados que muestren pérdida de cabello visible de Jackson Labs. Las cepas de ratones establecidas por cada investigador principal participante se alojarán en sus respectivos recintos de alojamiento de animales. Los ratones tendrán acceso gratuito a la dieta de agua y gránulos (dieta para roedores 5010, LabDiet, PMI Nutrition International).

- 15 Se establecerá un cultivo celular primario para componentes individuales de la piel y del folículo, así como cultivos de pelo/órganos de la piel para ratones de tipo salvaje y transgénicos o noqueados. Estos estudios también involucran la caracterización del folículo piloso y del tejido de la piel. Los ratones serán sacrificados por asfixia con CO₂ seguido de dislocación cervical, un método aprobado por veterinarios y ampliamente recomendado. Es el método más rápido y humano que no está asociado con ningún dolor o estrés para los animales. Los ratones se afeitarán en la superficie dorsal con un cortador eléctrico y luego se disecará el tejido de la piel. El esquema de aislamiento de los componentes celulares individuales de la piel y el folículo piloso, así como el aislamiento de las células T de los explantes de la piel se describe en las Figuras 25, 28 y 29. Las muestras de piel también se incluirán en OCT y parafina. Además de la piel, el bazo y el timo también se diseccionarán de los animales y se utilizarán para la citometría de flujo. El suero de los animales también se recogerá por sangrado de la cola y se utilizará para el perfil de citoquinas.

Referencias

- 30 1. de Jong, A., Pena-Cruz, V., Cheng, T.Y., Clark, R.A., Van Rhijn, I., and Moody, D.B. 2010. CD1a-autoreactive T cells are a normal component of the human alpha beta T cell repertoire. *Nat Immunol* 11:1102-1109.
- 35 2. Clark, R.A., Chong, B.F., Mirchandani, N., Yamanaka, K., Murphy, G.F., Dowgiert, R.K., and Kupper, T.S. 2006. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol* 126:1059-1070.
- 40 3. Bhagat, G., Naiyer, A.J., Shah, J.G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T.C., Green, P.H., and Manavalan, J.S. 2008. Small intestinal CD8+TCRgamma delta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 118:281-293.
- 45 4. Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21:357-366.
- 50 5. Winchester, R., Wiesendanger, M., O'Brien, W., Zhang, H.Z., Maurer, M.S., Gillam, L.D., Schwartz, A., Marboe, C., and Stewart, A.S. 2011. Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis. *J Immunol* 187:1006-1014.
- 55 6. Wu, H.D., Maurer, M.S., Friedman, R.A., Marboe, C.C., Ruiz-Vazquez, E.M., Ramakrishnan, R., Schwartz, A., Tilson, M.D., Stewart, A.S., and Winchester, R. 2007. The lymphocytic infiltration in calcific aortic stenosis predominantly consists of clonally expanded T cells. *J Immunol* 178:5329-5339.
- 60 7. Curran, S.A., FitzGerald, O.M., Costello, P.J., Selby, J.M., Kane, D.J., Bresnihan, B., and Winchester, R. 2004. Nucleotide sequencing of psoriatic arthritis tissue before and during methotrexate administration reveals a complex inflammatory T cell infiltrate with very few clones exhibiting features that suggest they drive the inflammatory process by recognizing autoantigens. *J Immunol* 172:1935-1944.
- 65 8. McKinney, E.F., Lyons, P.A., Carr, E.J., Hollis, J.L., Jayne, D.R., Willcocks, L.C., Koukoulaki, M., Brazma, A., Jovanovic, V., Kemeny, D.M., et al. 2010. A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease. *Nat Med* 16:586-591, 581p following 591.
9. Van Belle, T.L., and von Herrath, M.G. 2009. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol Immunol* 47:8-11.
10. Meresse, B., Curran, S.A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., et al. 2006. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* 203:1343-1355.

11. Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Ehrlich, L.R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J.A., and Lanier, L.L. 2004. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20:757-767.
- 5 12. Andersson, A.K., Sumariwalla, P.F., McCann, F.E., Amjadi, P., Chang, C., McNamee, K., Tornehave, D., Haase, C., Agerso, H., Stennicke, V.W., et al. 2011. Blockade of NKG2D ameliorates disease in mice with collagen-induced arthritis: A potential pathogenic role in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 63:2617-2629.
- 10 13. Groh, V., Bruhl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., and Spies, T. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9452-9457.
14. Killock, D. 2011. Experimental arthritis: NKG2D: a potential therapeutic target in RA? *Nat Rev Rheumatol* 7:438.
- 15 15. Philpott, M.P., Sanders, D.A., and Kealey, T. 1996. Whole hair follicle culture. *Dermatol Clin* 14:595-607.
16. Kondo, S., Hozumi, Y., and Aso, K. 1990. Organ culture of human scalp hair follicles: effect of testosterone and oestrogen on hair growth. *Arch Dermatol Res* 282:442-445.
- 20 17. Companjen, A.R., van der Wel, L.I., Wei, L., Laman, J.D., and Prens, E.P. 2001. A modified ex vivo skin organ culture system for functional studies. *Arch Dermatol Res* 293:184-190.
18. Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K., Dowgiert, R.K., and Kupper, T.S. 2006. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176:4431-4439.
- 25 19. Freyschmidt-Paul, P., McElwee, K.J., Hoffmann, R., Sundberg, J.P., Vitacolonna, M., Kissling, S., and Zoller, M. 2006. Interferon-gamma-deficient mice are resistant to the development of alopecia areata. *Br J Dermatol* 155:515-521.
- 30 20. Hirota, R., Tajima, S., Yoneda, Y., Okada, M., Tashiro, J., Ueda, K., Kubota, T., and Yoshida, R. 2003. Induction of hair regrowth in the alopecia site of IFN-gamma knockout mice by allografting and IFN-gamma injection into the transplantation site. *J Interferon Cytokine Res* 23:433-439.
- 35 21. Gilhar, A., Kam, Y., Assy, B., and Kalish, R.S. 2005. Alopecia areata induced in C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege. *J Invest Dermatol* 124:288-289.
22. Skurkovich, S., Korotky, N.G., Sharova, N.M., and Skurkovich, B. 2005. Treatment of alopecia areata with anti-interferon-gamma antibodies. *J Investig Dermatol Symp Proc* 10:283-284.
- 40 23. Nakamura, M., Jo, J., Tabata, Y., and Ishikawa, O. 2008. Controlled delivery of T-box21 small interfering RNA ameliorates autoimmune alopecia (Alopecia Areata) in a C3H/HeJ mouse model. *Am J Pathol* 172:650-658.
24. Subramanya, R.D., Coda, A.B., and Sinha, A.A. 2010. Transcriptional profiling in alopecia areata defines immune and cell cycle control related genes within disease-specific signatures. *Genomics* 96:146-153.
- 45 25. Barahmani, N., Lopez, A., Babu, D., Hernandez, M., Donely, S.E., and Duvic, M. 2009. Serum T helper 1 cytokine levels are greater in patients with alopecia areata regardless of severity or atopy. *Clin Exp Dermatol*.
- 50 26. Chu, S.Y., Chen, Y.J., Tseng, W.C., Lin, M.W., Chen, T.J., Hwang, C.Y., Chen, C.C., Lee, D.D., Chang, Y.T., Wang, W.J., et al. 2011. Comorbidity profiles among patients with alopecia areata: The importance of onset age, a nationwide population-based study. *J Am Acad Dermatol*.
27. Du Vivier, A., and Munro, D.D. 1975. Alopecia areata, autoimmunity, and Down's syndrome. *Br Med J* 1:191-192.
- 55 28. Goh, C., Finkel, M., Christos, P.J., and Sinha, A.A. 2006. Profile of 513 patients with alopecia areata: associations of disease subtypes with atopy, autoimmune disease and positive family history. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20:1055-1060.
29. Kasumagic-Halilovic, E. 2008. Thyroid autoimmunity in patients with alopecia areata. *Acta Dermatovenerol Croat* 16:123-125.
- 60 30. Puavilai, S., Puavilai, G., Charuwichitratana, S., Sakuntabhai, A., and Sriprachya-Anunt, S. 1994. Prevalence of thyroid diseases in patients with alopecia areata. *Int J Dermatol* 33:632-633.
- 65 31. Seyrafi, H., Akhiani, M., Abbasi, H., Mirpour, S., and Gholamrezanezhad, A. 2005. Evaluation of the profile of alopecia areata and the prevalence of thyroid function test abnormalities and serum autoantibodies in Iranian patients. *BMC Dermatol* 5:11.

32. Wang, S.J., Shohat, T., Vadheim, C., Shellow, W., Edwards, J., and Rotter, J.I. 1994. Increased risk for type I (insulin-dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata (AA). *Am J Med Genet* 51:234-239.

- 5 33. Yano, S., Ihn, H., Nakamura, K., Okochi, H., and Tamaki, K. 1999. Antinuclear and antithyroid antibodies in 68 Japanese patients with alopecia areata. *Dermatology* 199:191.

Ejemplo 6

- 10 Se realizaron estudios preclínicos in vivo de bloqueo de Jak1/Jak2 usando el inhibidor INCB018424 Jak1/Jak2 en el modelo animal injertado de la enfermedad, ratones C3H-HeJ. 0/5 ratones desarrollaron alopecia después del tratamiento con INCB018424, mientras que 2/5 ratones tratados con placebo desarrollaron AA.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de Jak1 y/o Jak2 seleccionado del grupo que consiste en: AG490 con el No CAS 133550-30-8; CYT387 con el No. CAS 1056634-68-4; SB1518 con el No. CAS 937272-79-2; TG101348 con el No. CAS 936091-26-8; BMS-911543 con el No. CAS 1271022-90-2; WP-1034 con el No. CAS 857064-42-7; CEP-701 con el No. CAS 111358-88-4; INCB 018424 con el No. CAS 941678-49-5; y LY3009104 con el No. CAS 1187594-09-7 para usar en un método de tratamiento de un trastorno de pérdida de cabello seleccionado del grupo que consiste en alopecia areata y alopecia androgenética en un mamífero que lo necesite.
2. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento se logra induciendo el crecimiento del cabello en el sujeto.
3. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor es INCB 018424 con el No. CAS 941678-49-5.
4. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor es LY3009104 con el No. CAS 1187594-09-7.
5. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor es AG490 con el No. CAS 133550-30-8; CYT387 con el No. CAS 1056634-68-4; SB1518 con el No. CAS 937272-79-2; TG101348 con el No. CAS 936091-26-8; BMS-911543 con el No. CAS 1271022-90-2; WP-1034 con el No. CAS 857064-42-7, o CEP-701 con el No. CAS 111358-88-4.
6. El inhibidor de Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno de pérdida de cabello es alopecia areata.
7. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno de pérdida de cabello es alopecia androgenética.
8. El inhibidor Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la alopecia areata es alopecia total o alopecia universal.
9. El inhibidor de Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de Jak1 y/o Jak2 está en una composición adecuada para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral, nasal, transdérmica, tópica, transmucosa o rectal.
10. El inhibidor de Jak1 y/o Jak2 para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor de Jak1 y/o Jak2 está en una composición adecuada para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral, nasal, transdérmica, tópica, administración transmucosa o rectal.

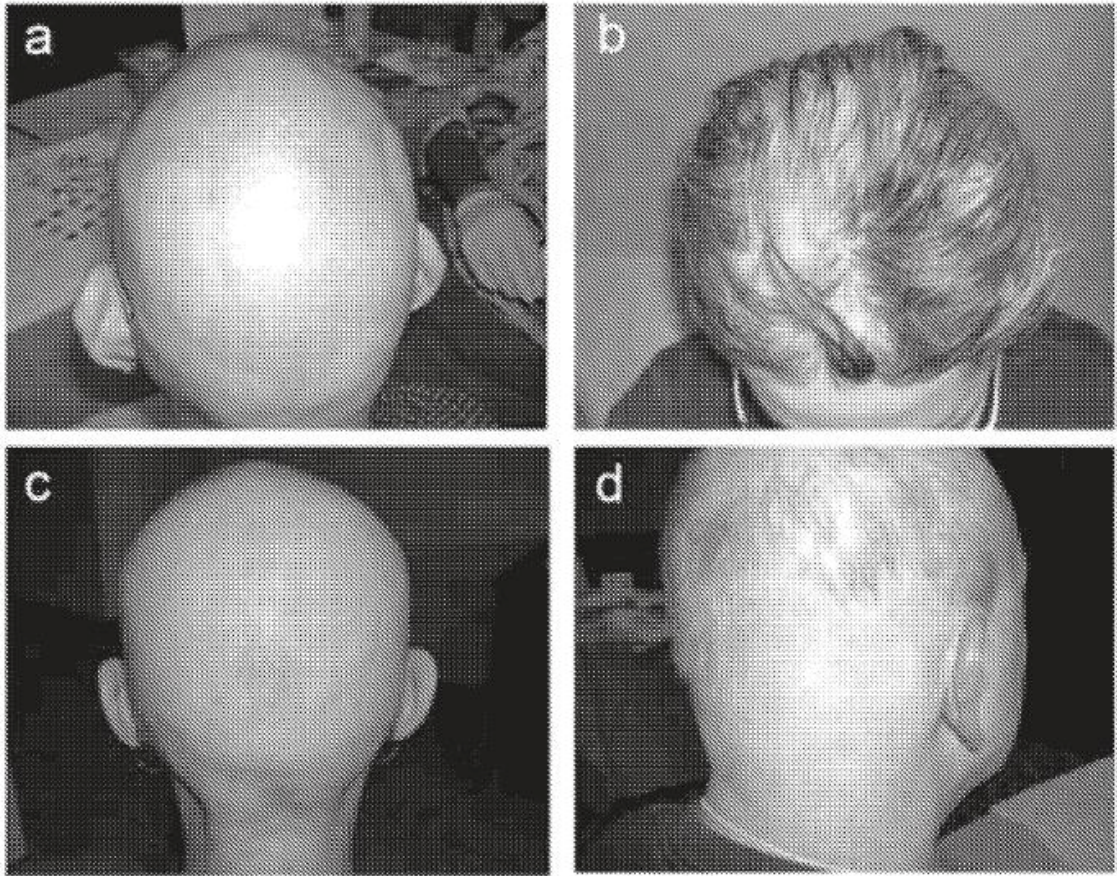


FIG. 1

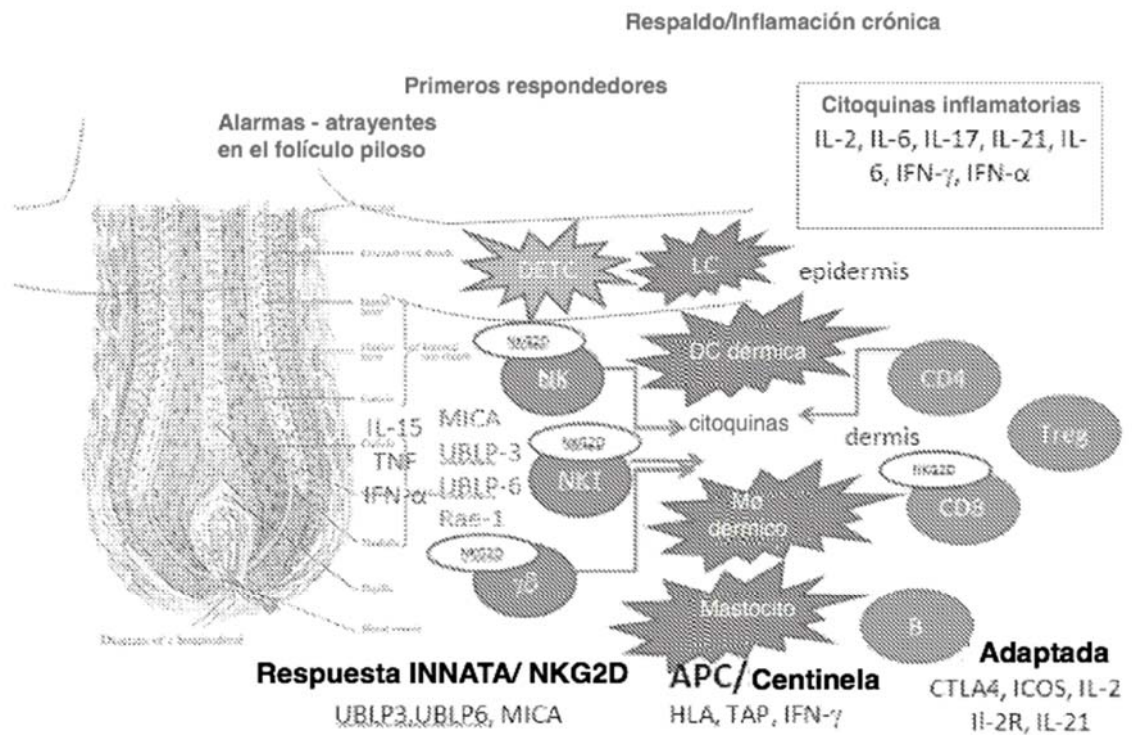


FIG. 2

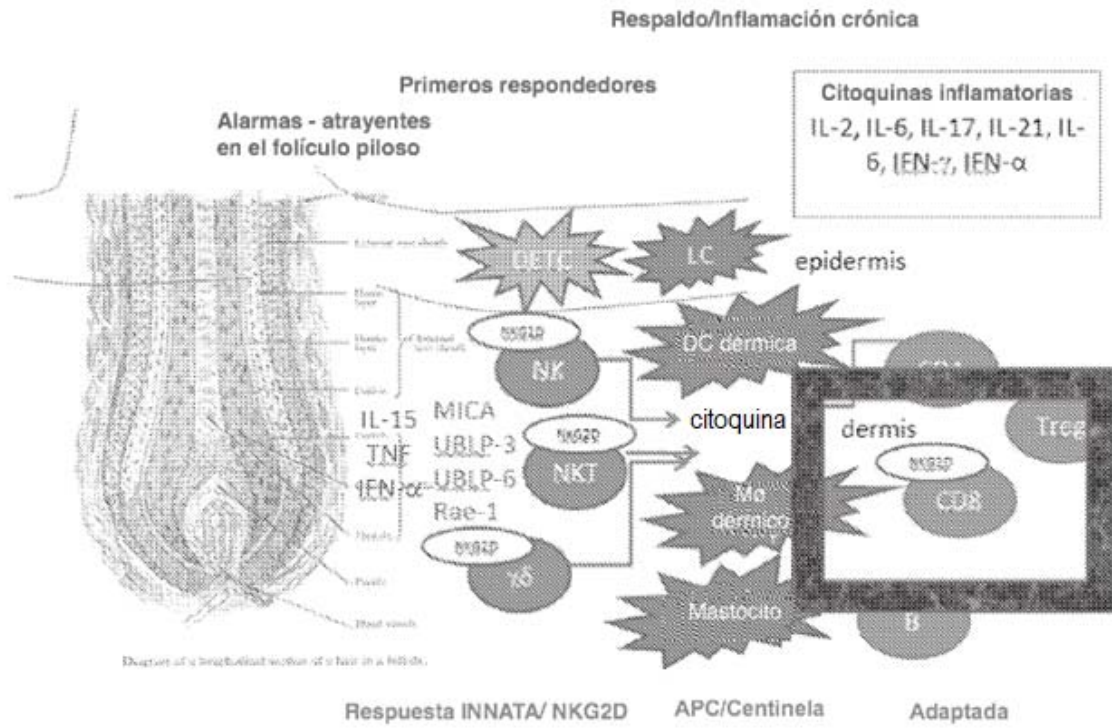
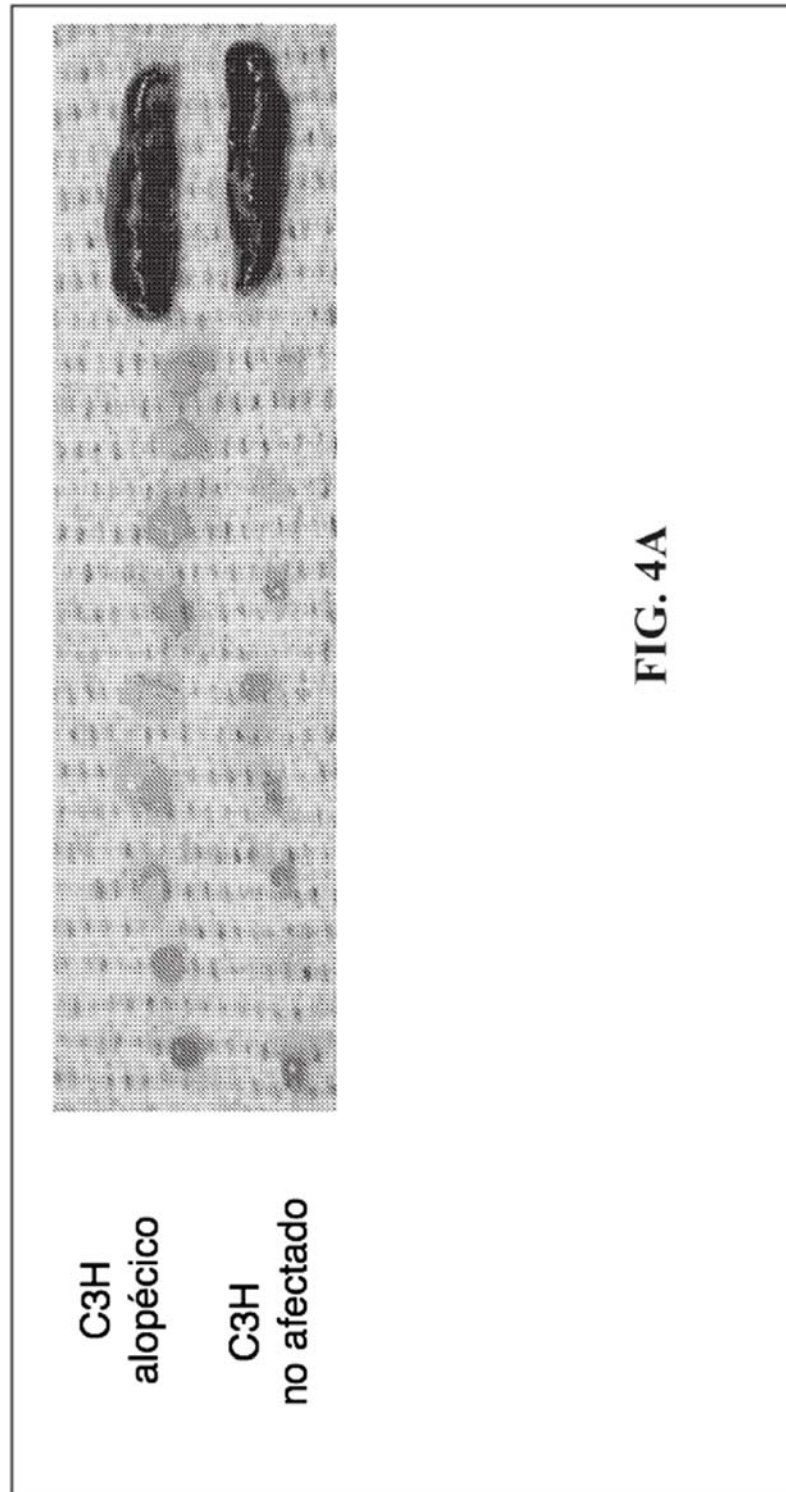


FIG. 3



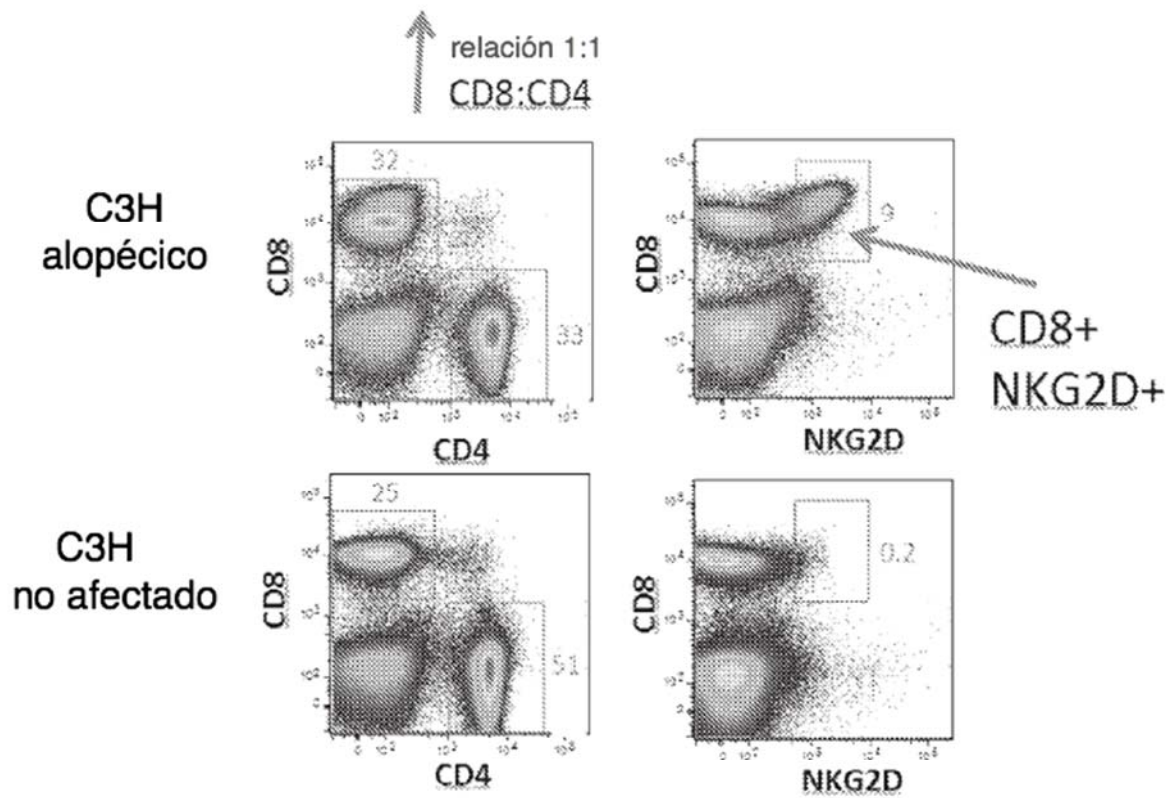


FIG. 4B

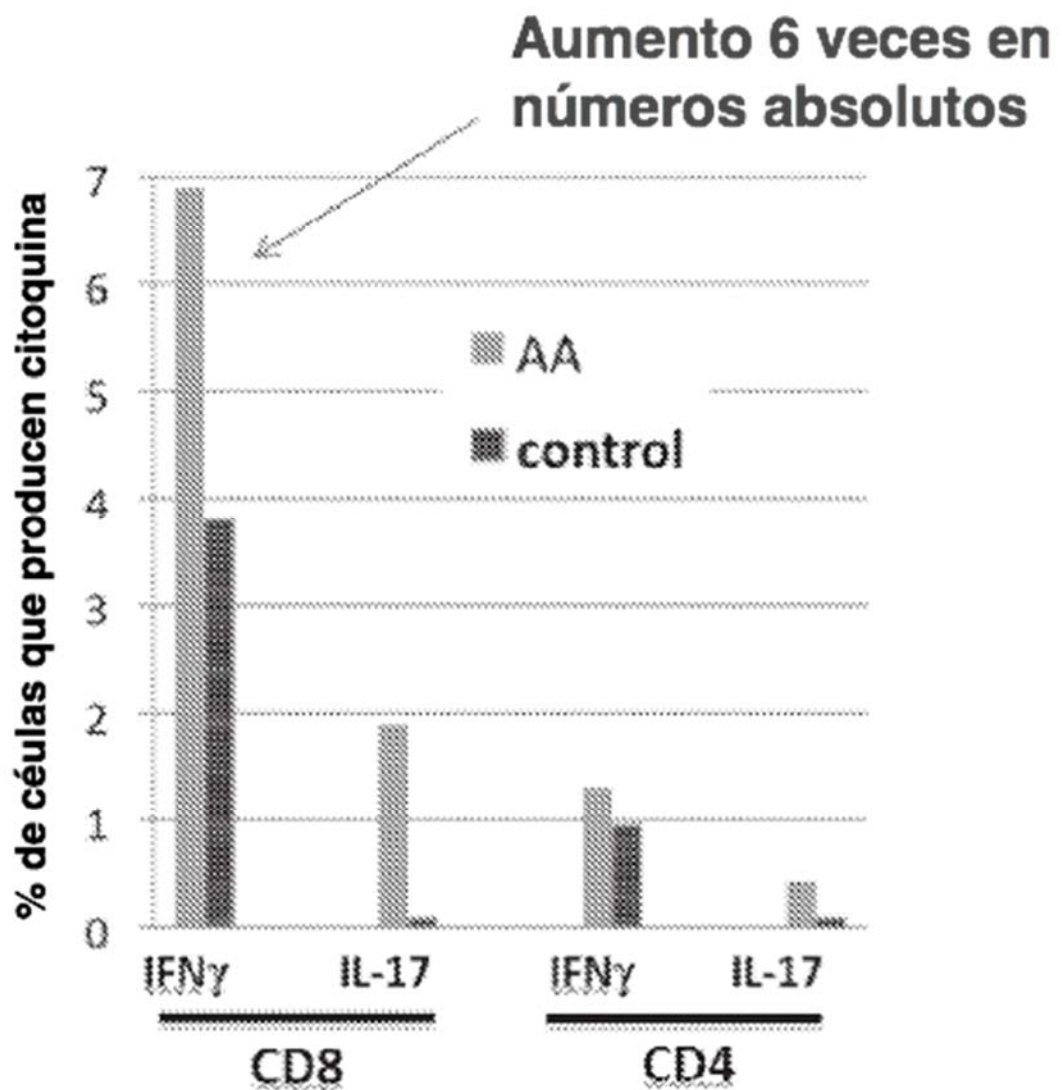


FIG. 4C

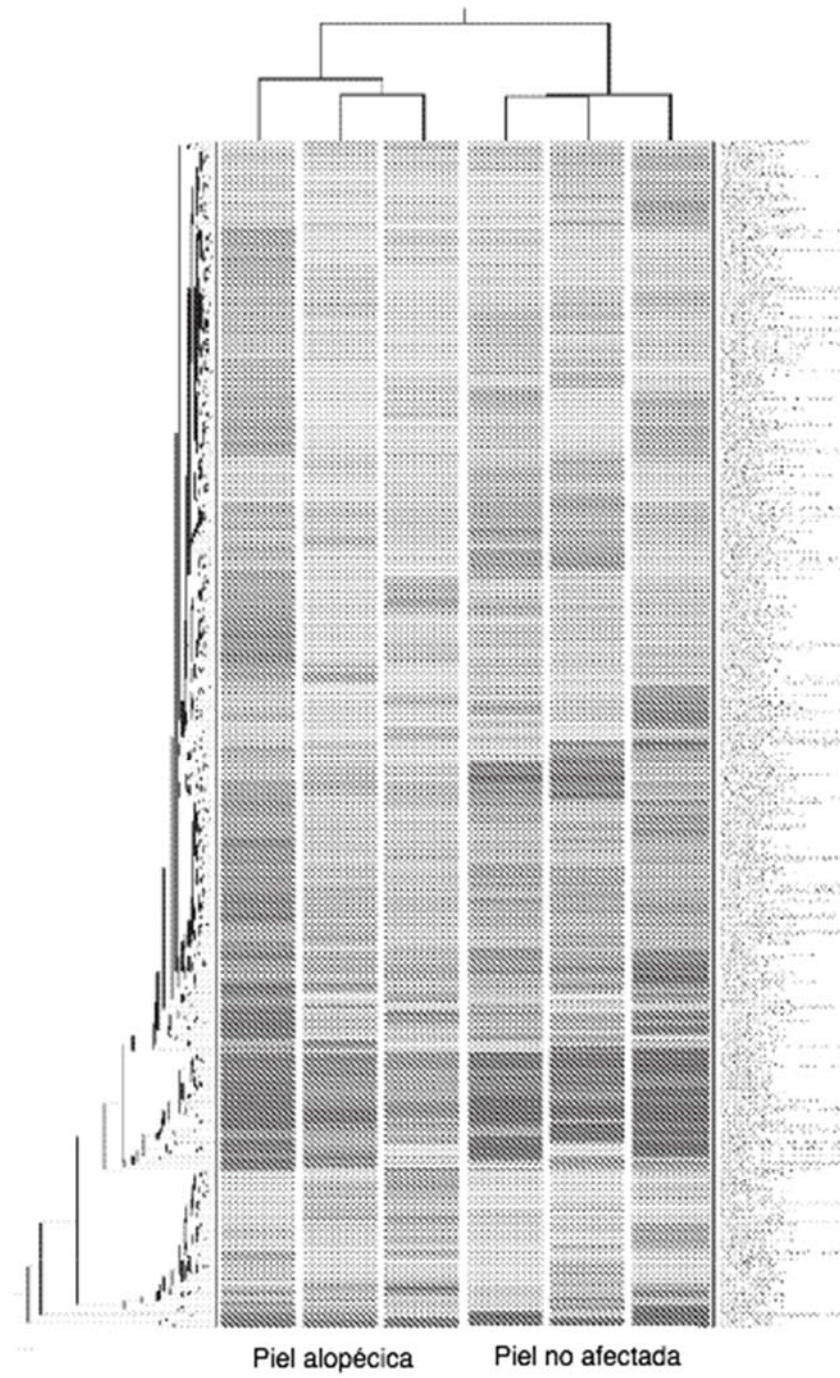


FIG. 5A

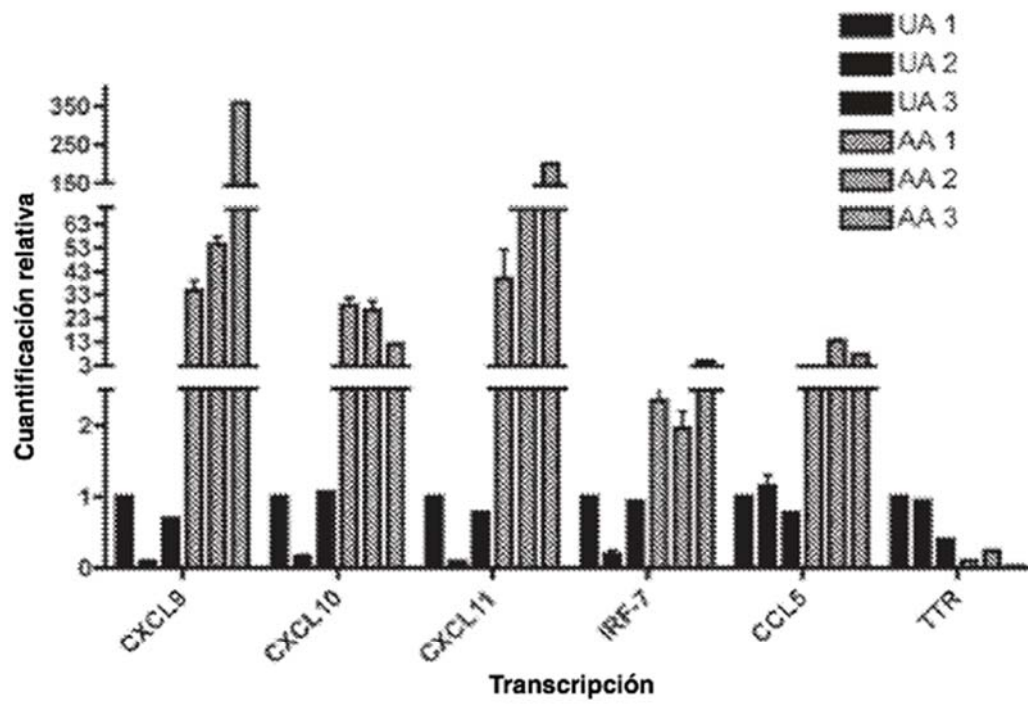


FIG. 5B

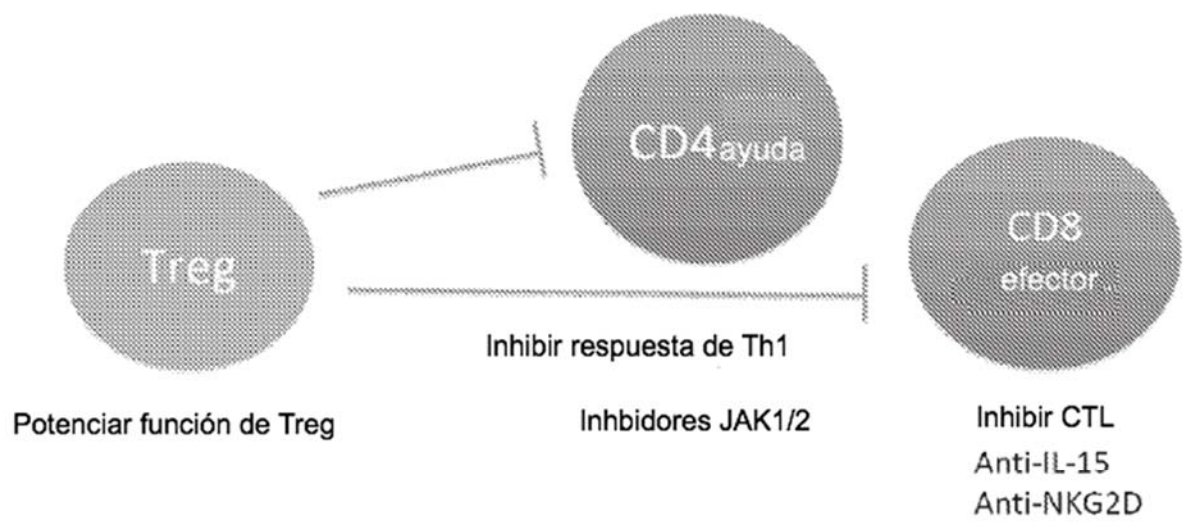


FIG. 6

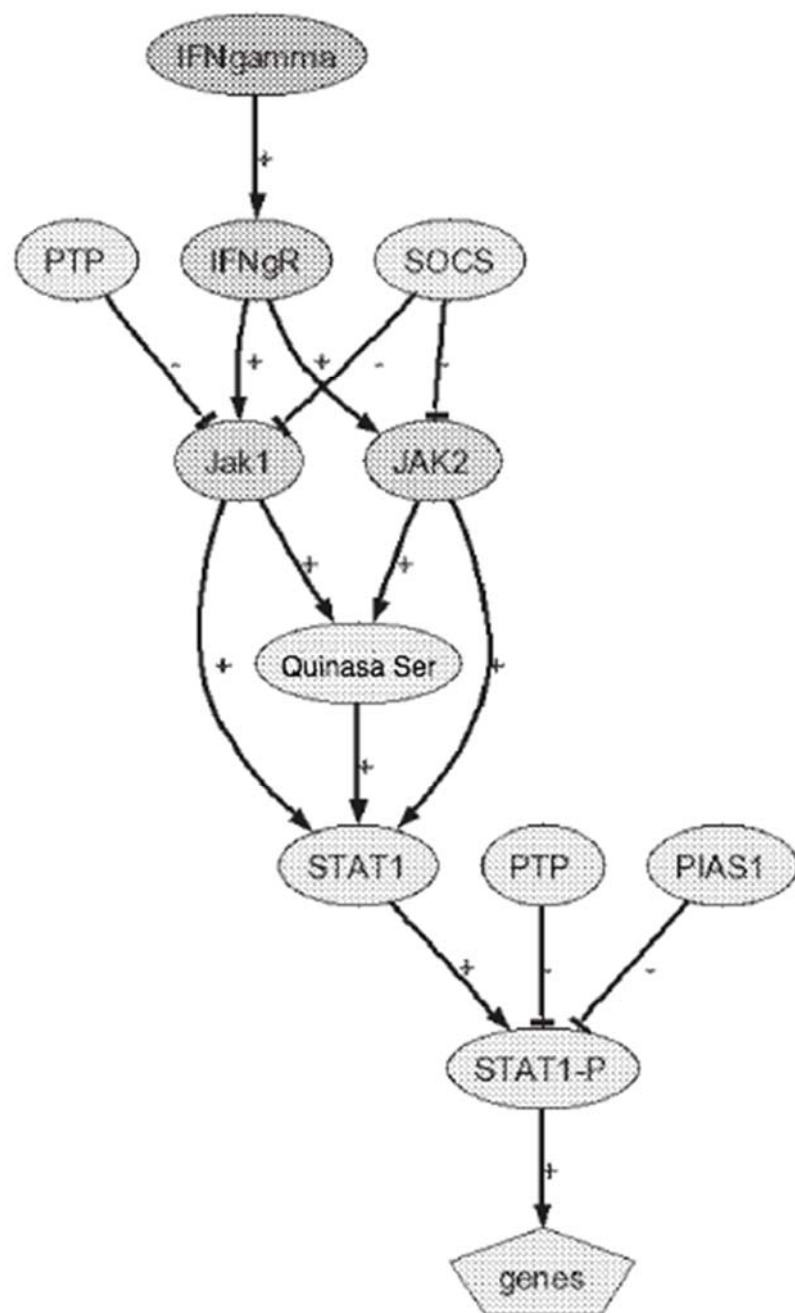


FIG. 7

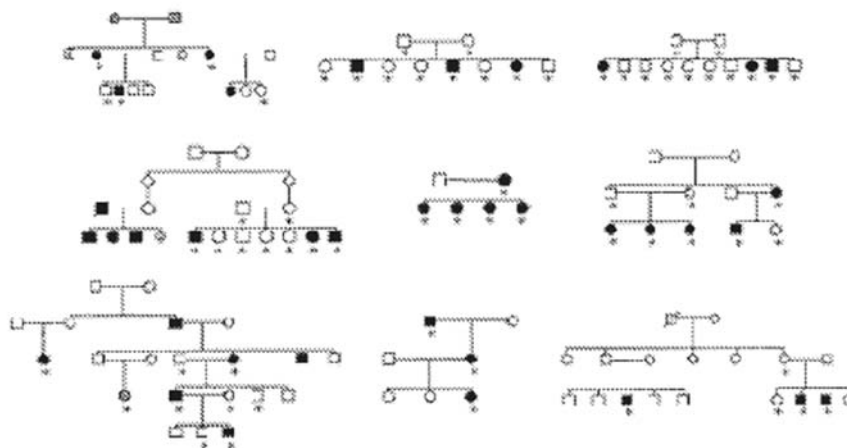


FIG. 8A

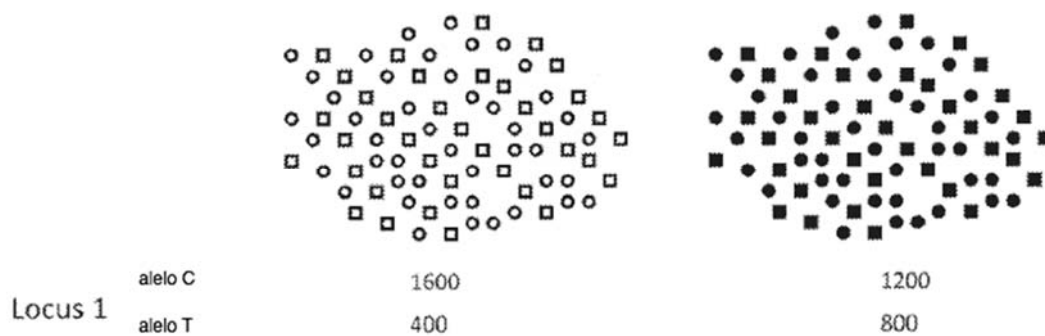


FIG. 8B

Análisis conjunto de ~1000 casos vs ~3000 controles

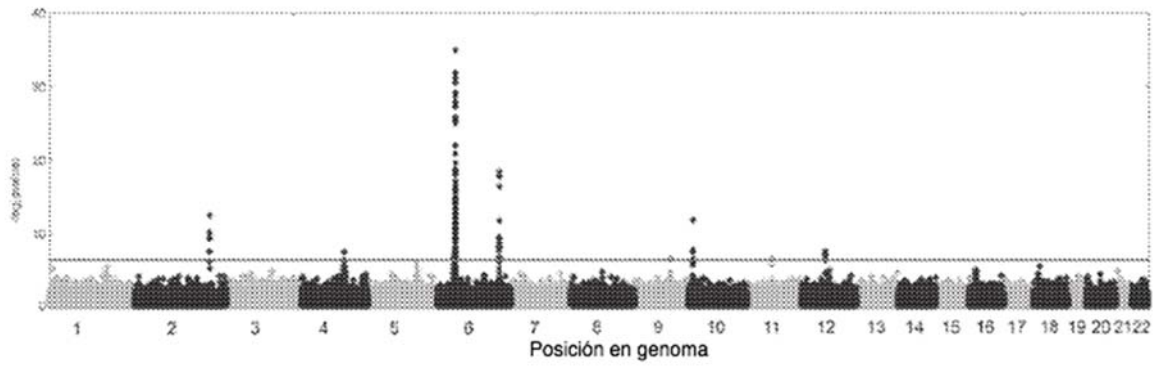


FIG. 9

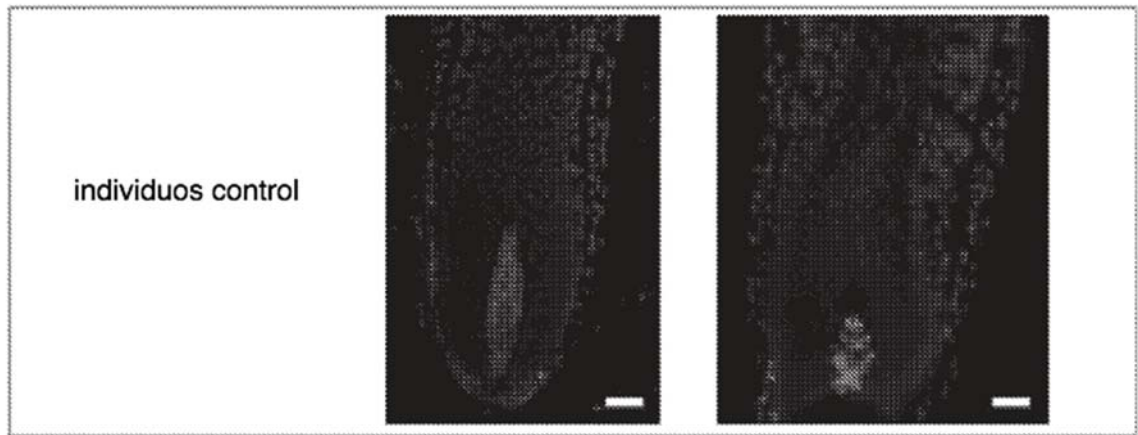


FIG. 10A

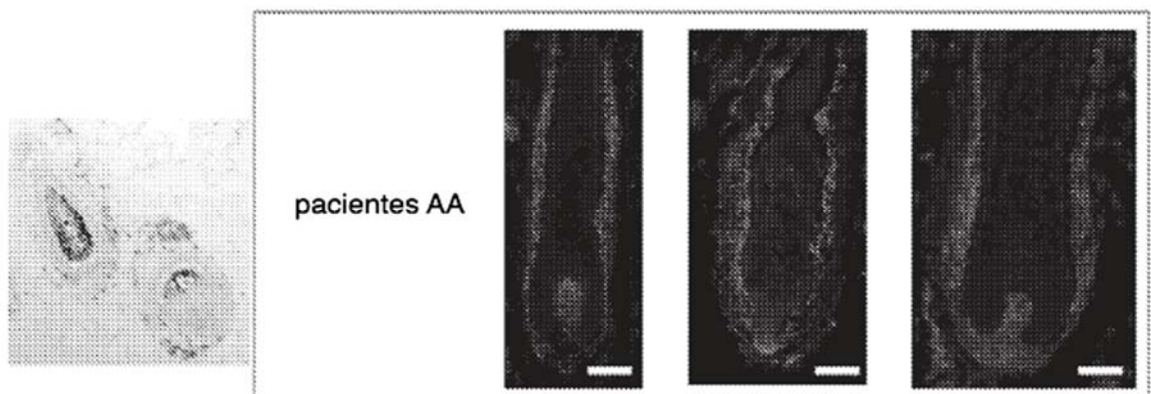


FIG. 10B

AA
"Pre-2010"
Enjambre de abejas

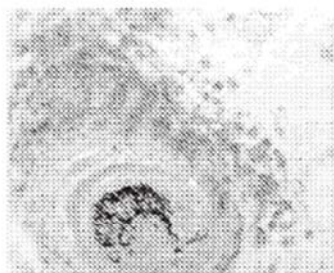


FIG. 11A

AA
"2010": Las abejas son identificadas

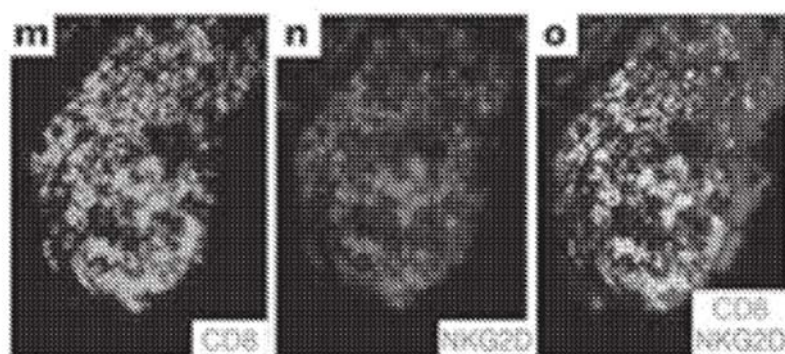
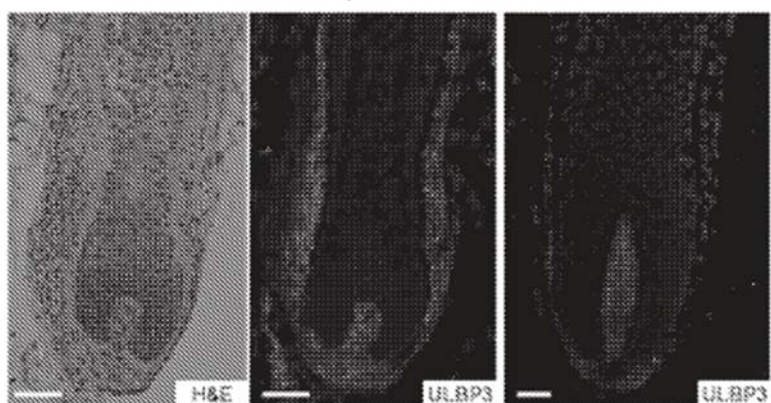


FIG. 11B

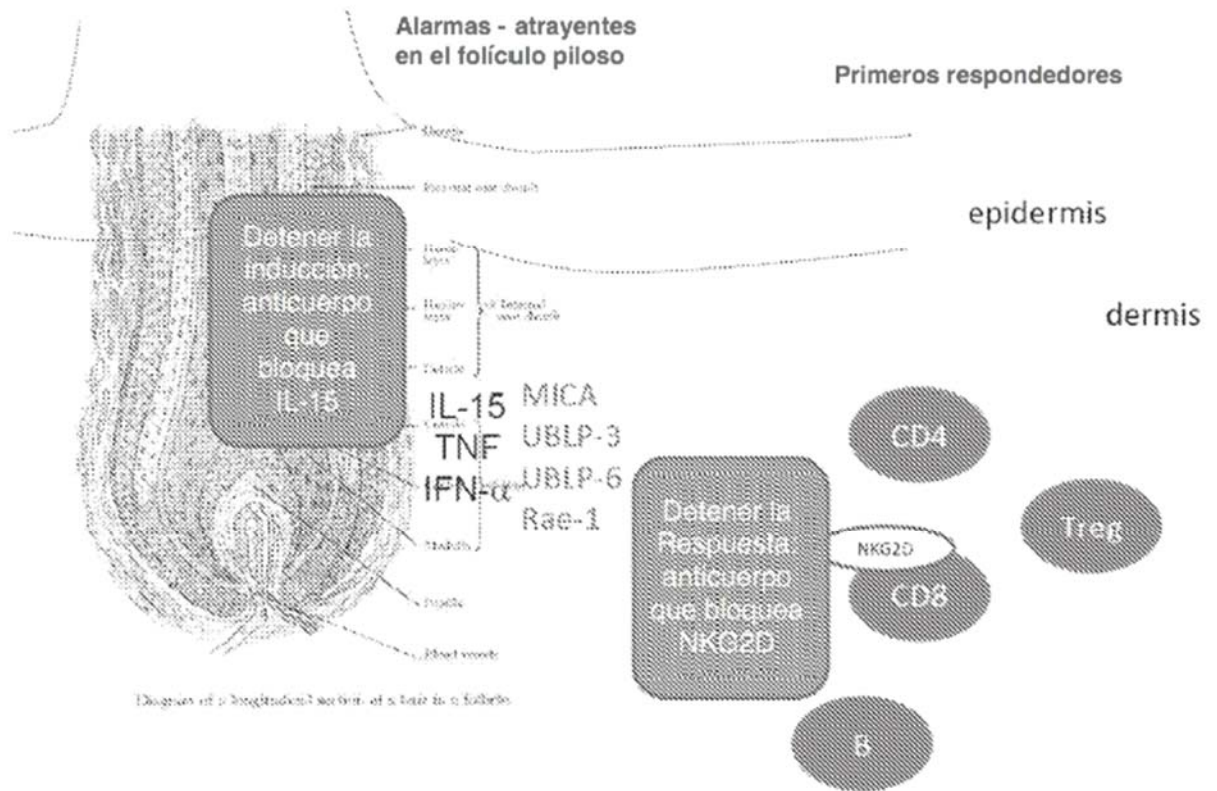


FIG. 12

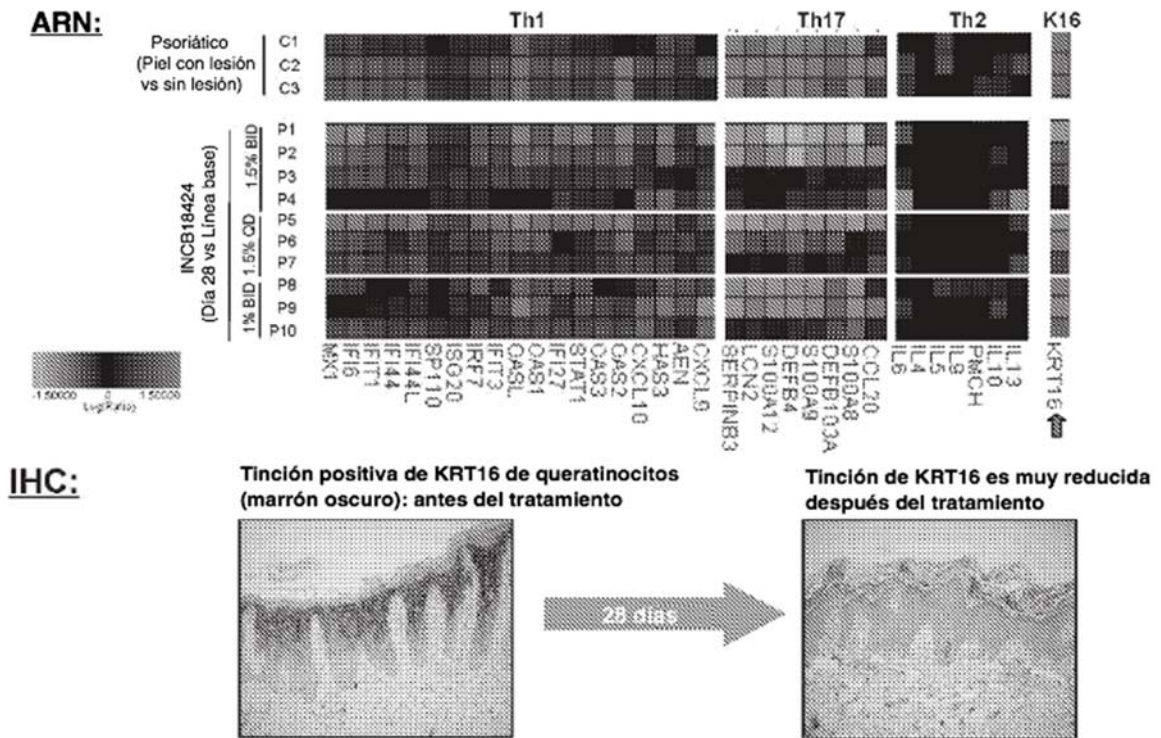
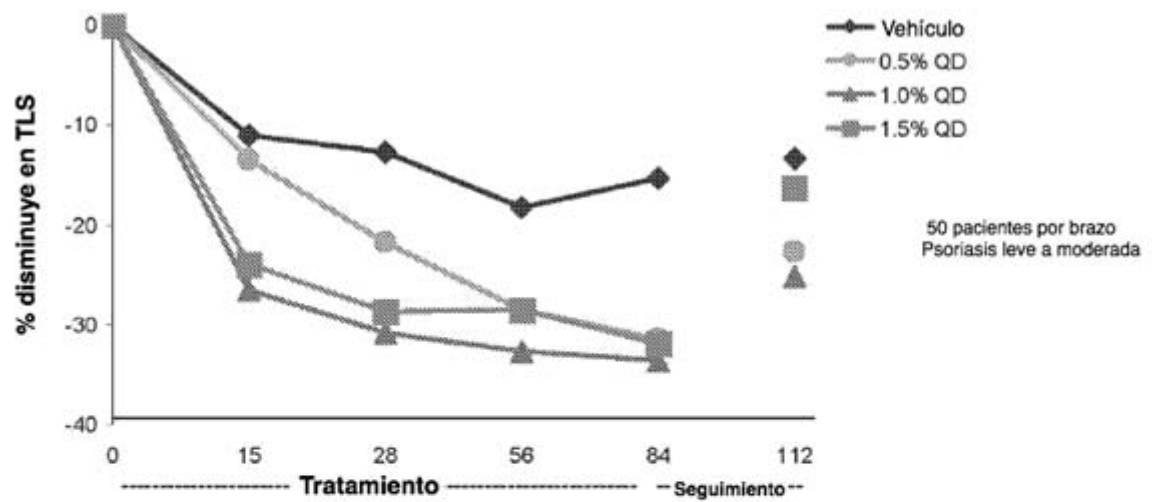


Figura 13



**Todos los grupos de dosis fueron estadísticamente
significativos vs vehículo en Día 84**

FIG. 14

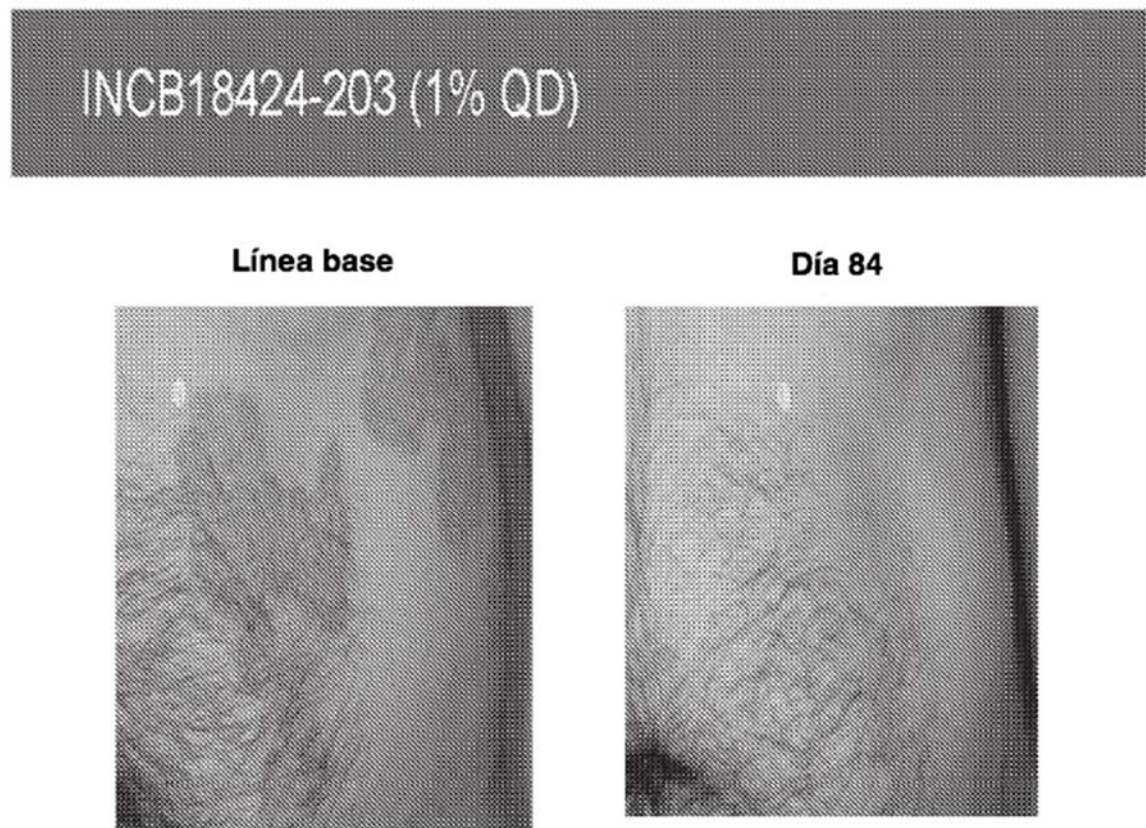


FIG. 15A

INCB018424 mejora histología de la piel

- Tratamiento con INCB018424 reduce notablemente el engrosamiento epidérmico y la inflamación dérmica
- No se observó adelgazamiento patológico de la piel

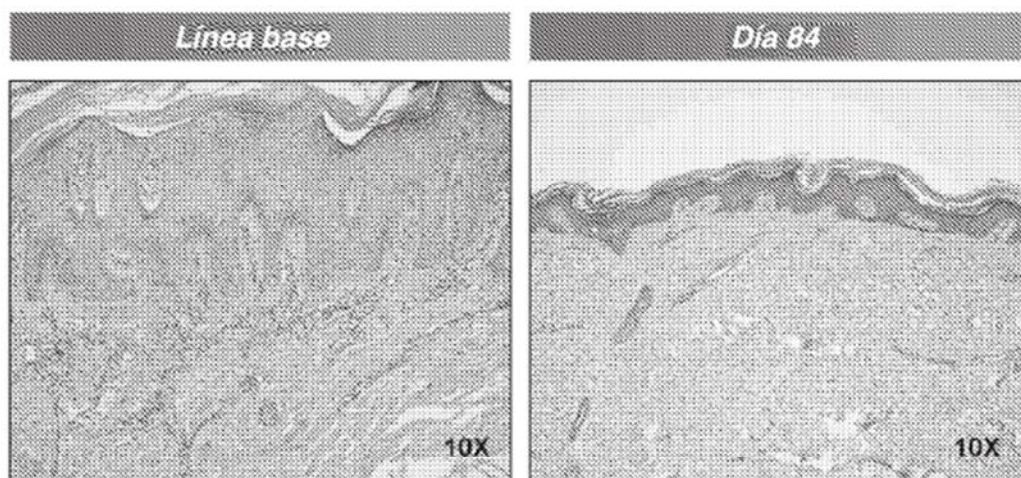


FIG. 15B

Terapias objetivo en Alopecia Areata

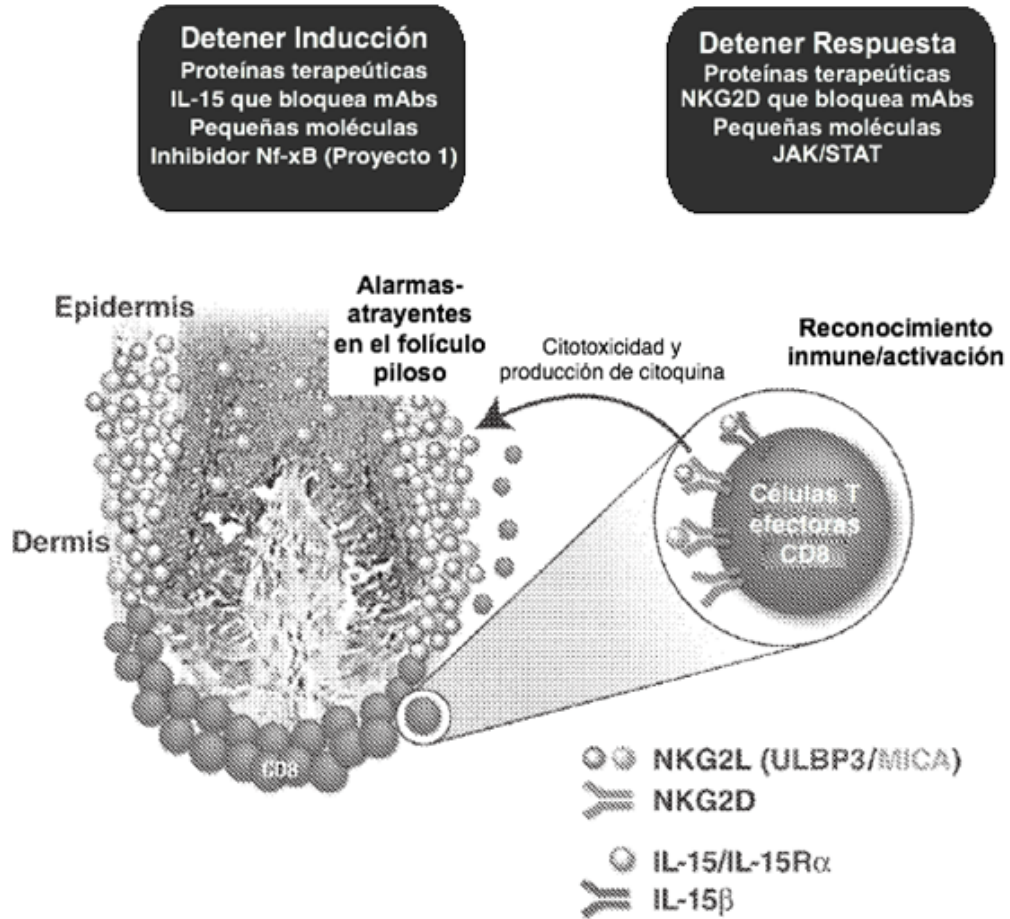


FIG. 16

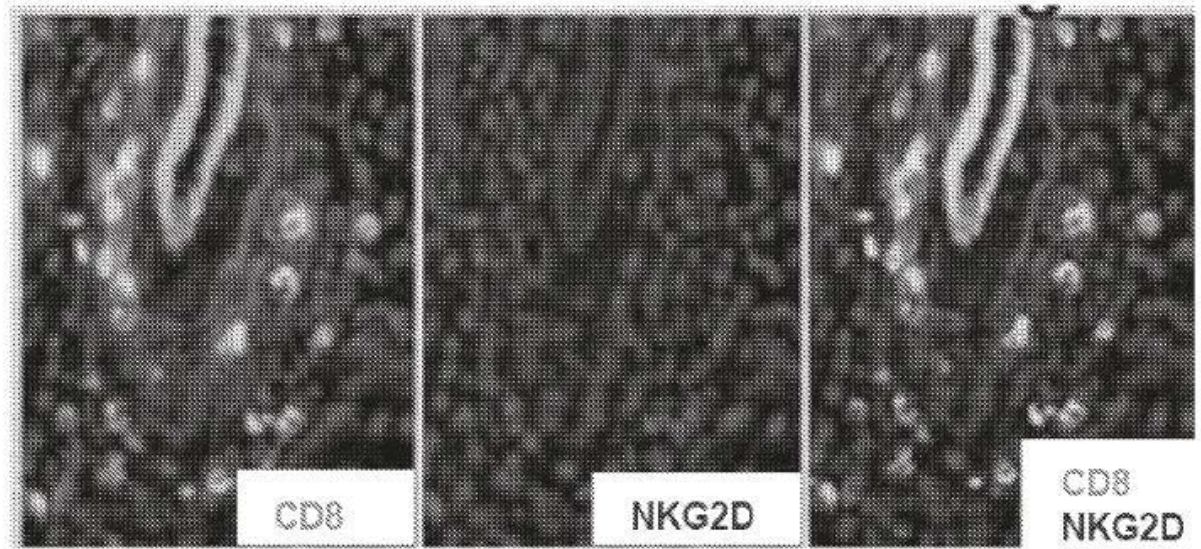


FIG. 17

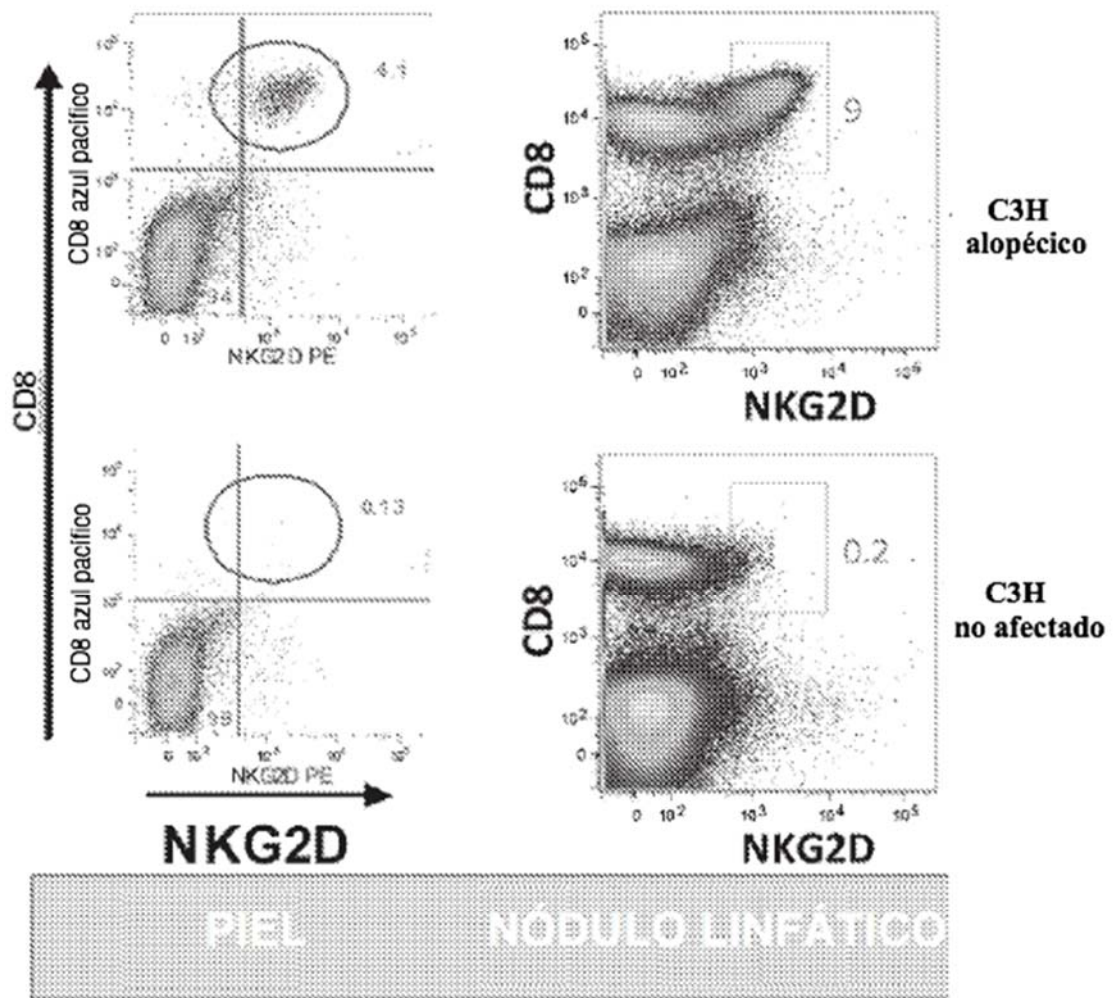


FIG. 18

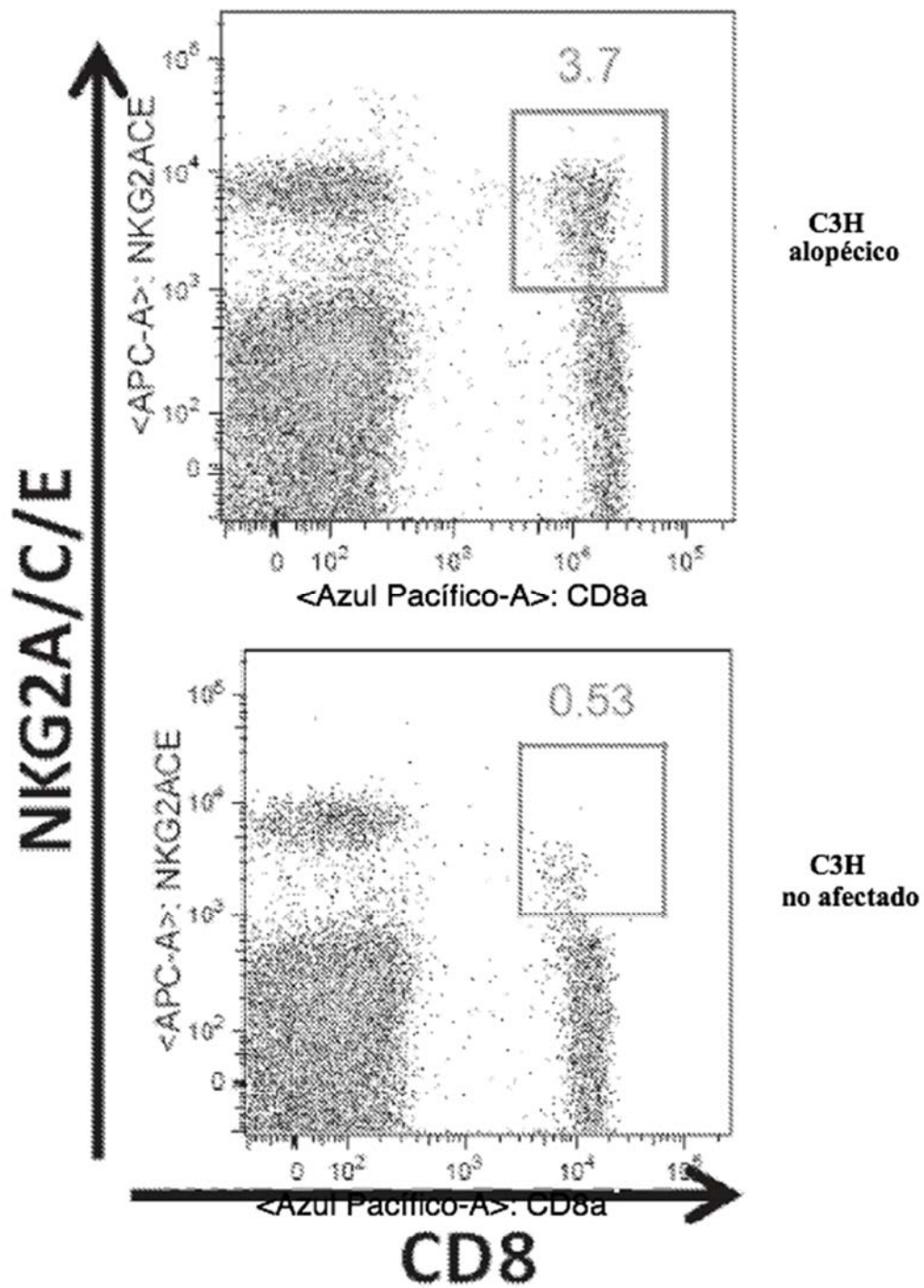


FIG. 18 (continuación)

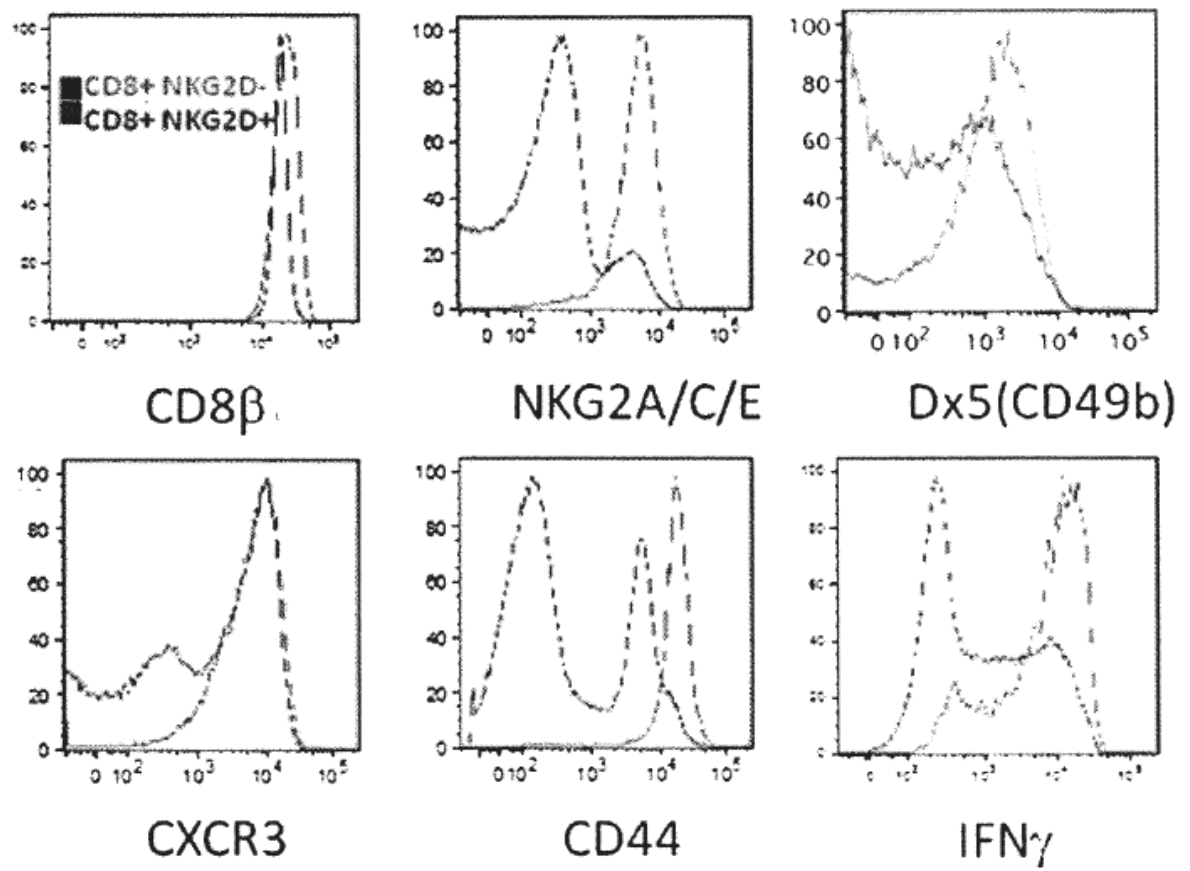


FIG. 19

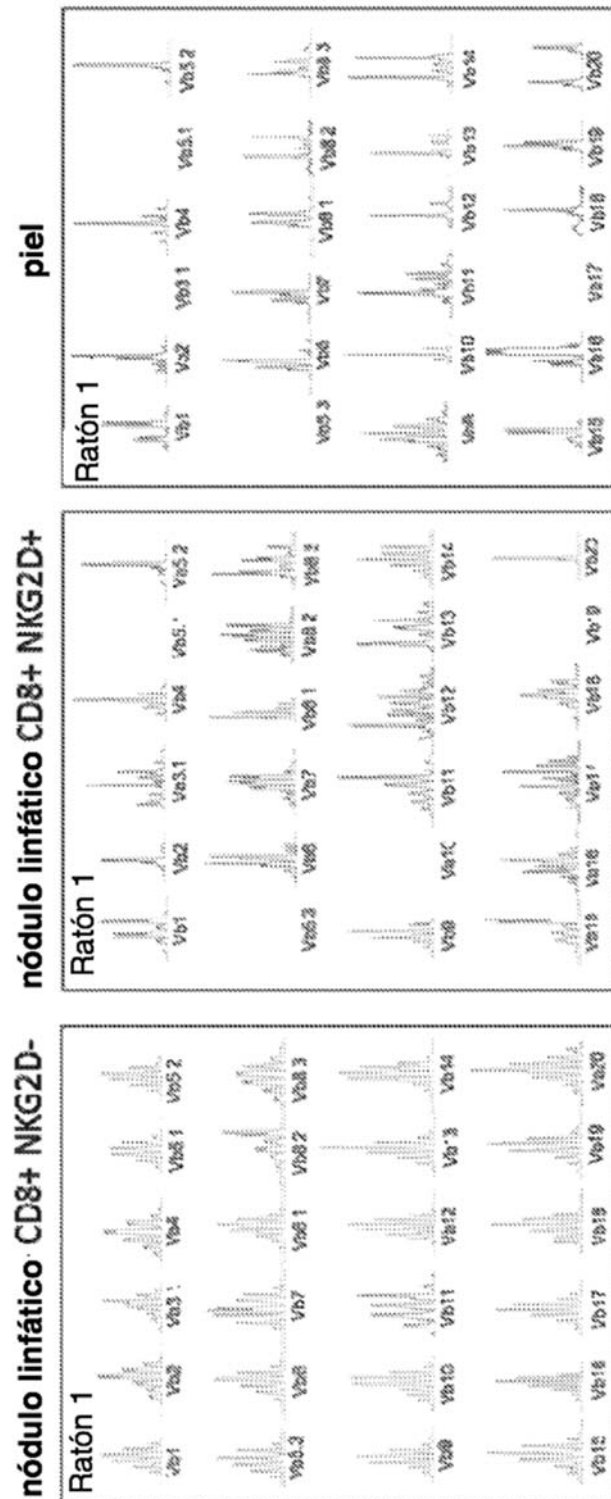


FIG. 20

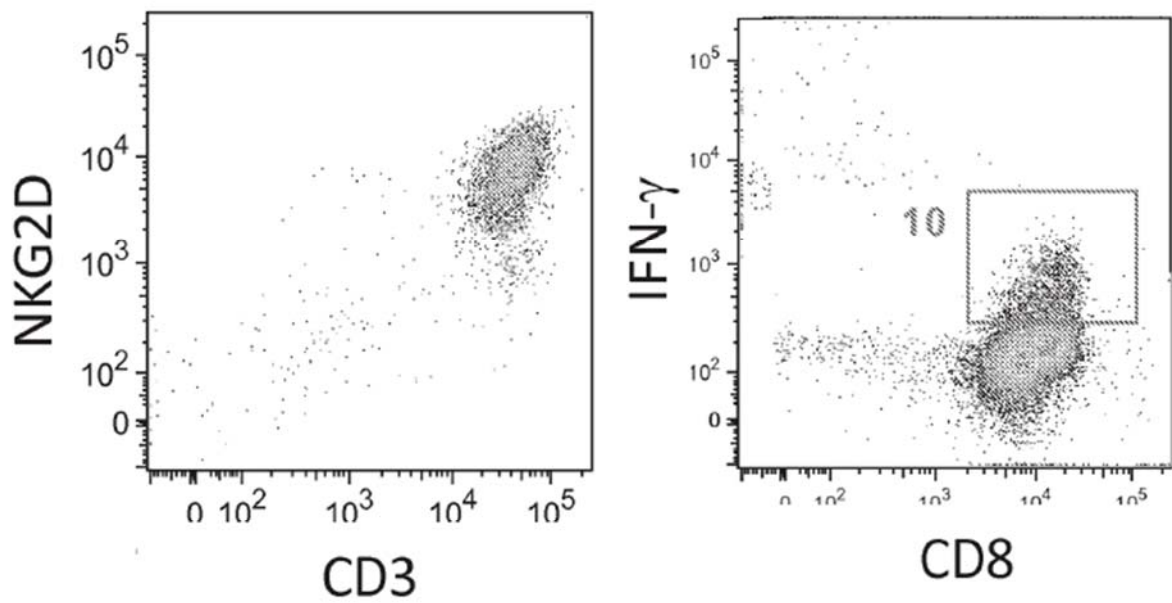


FIG. 21A

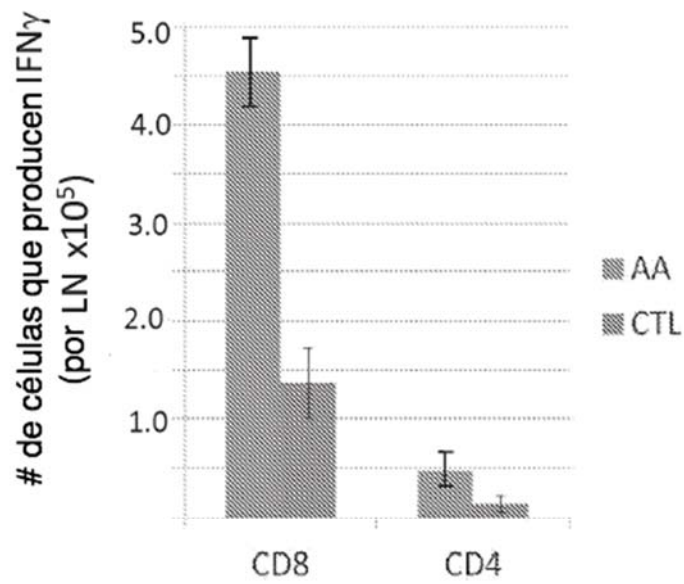


FIG. 21B

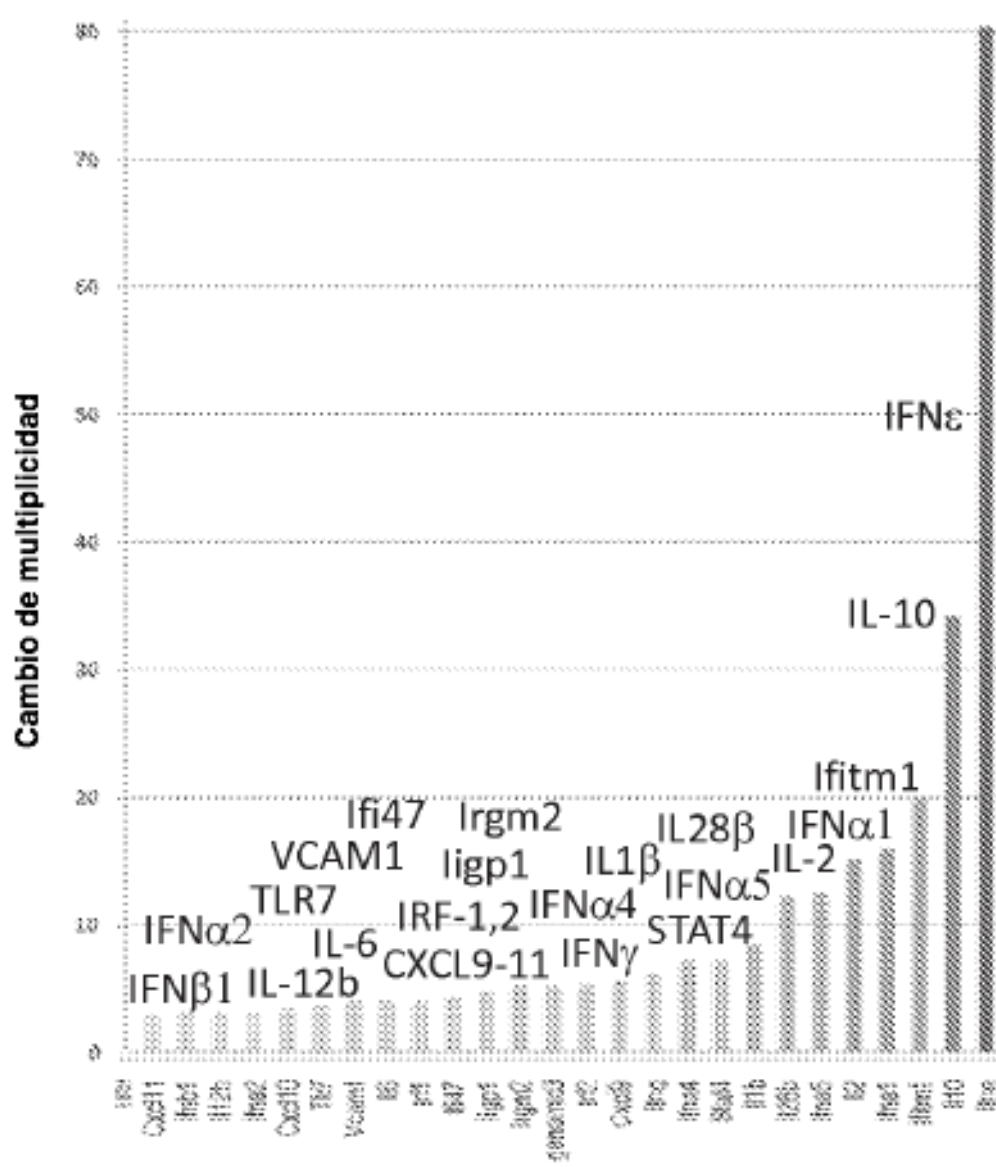


FIG. 22

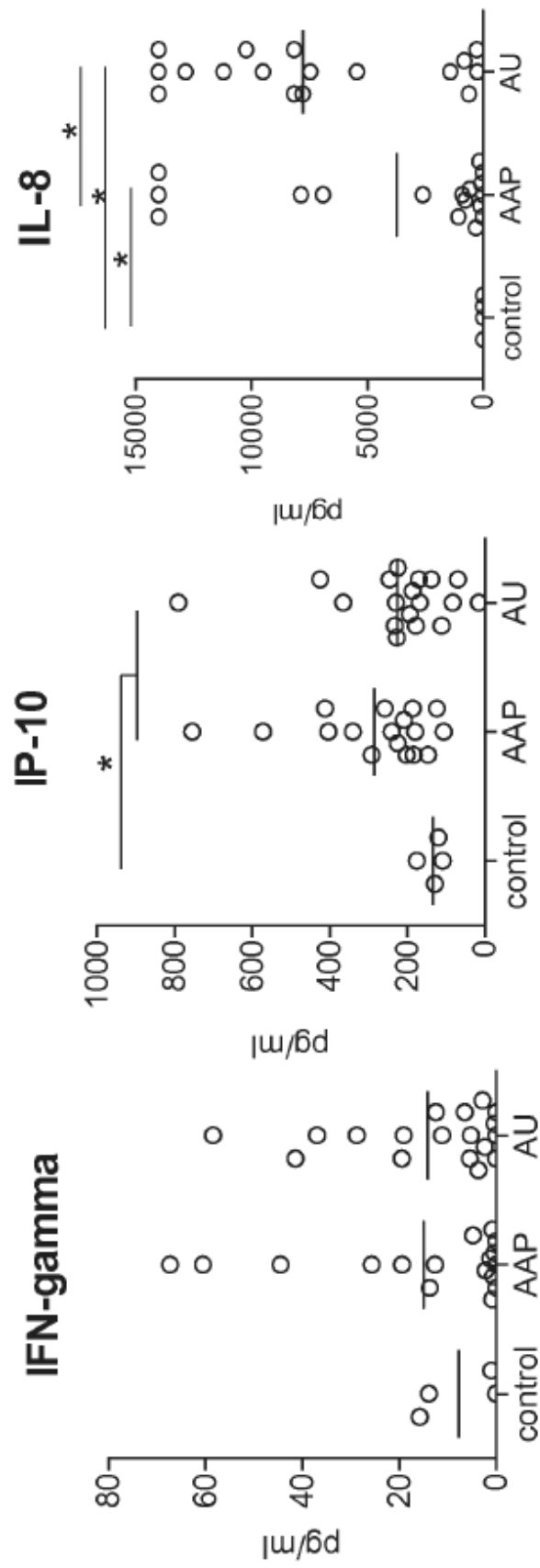


FIG. 23

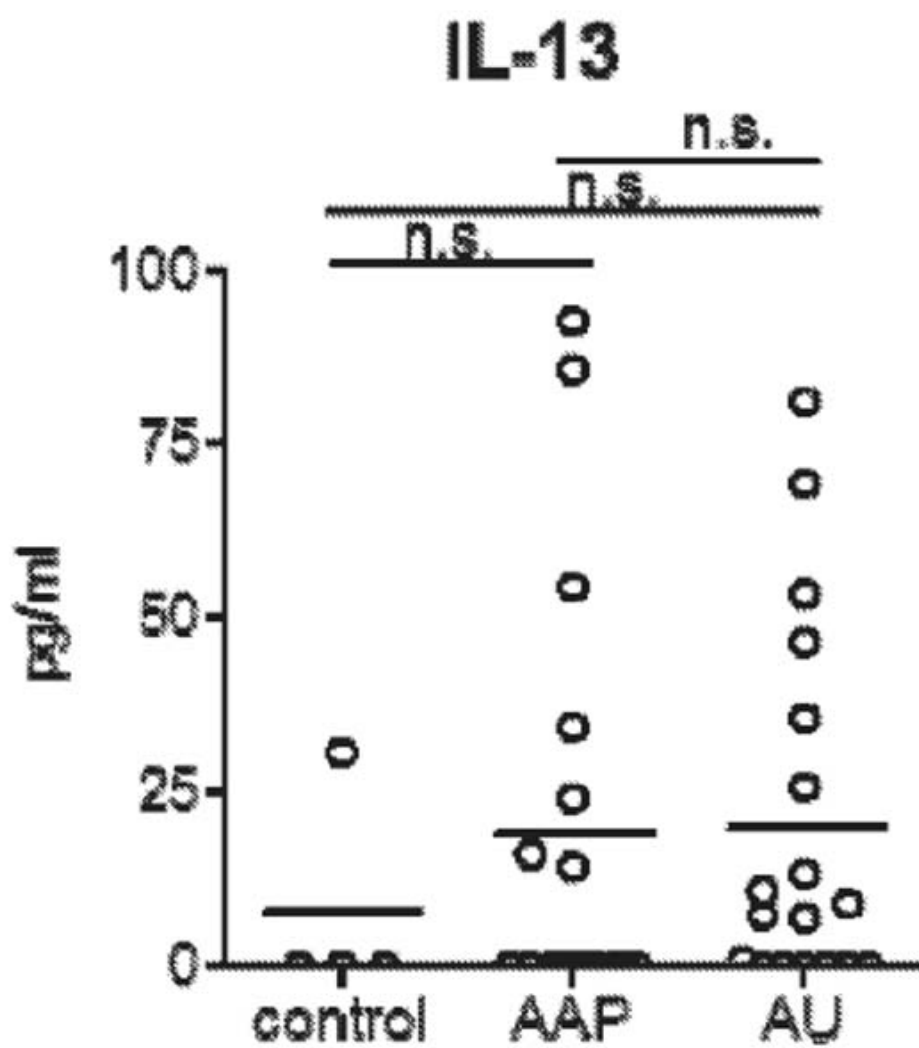


Fig. 24

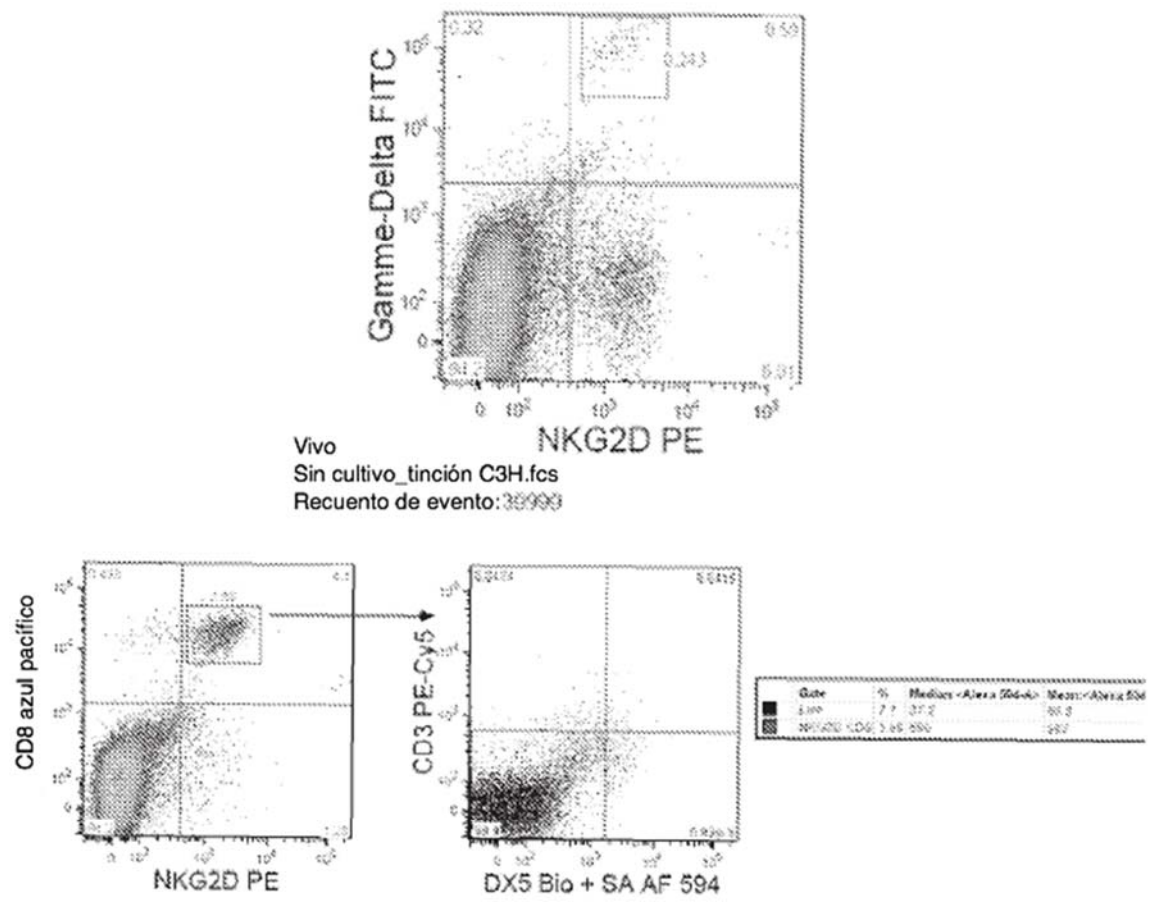


FIG. 25

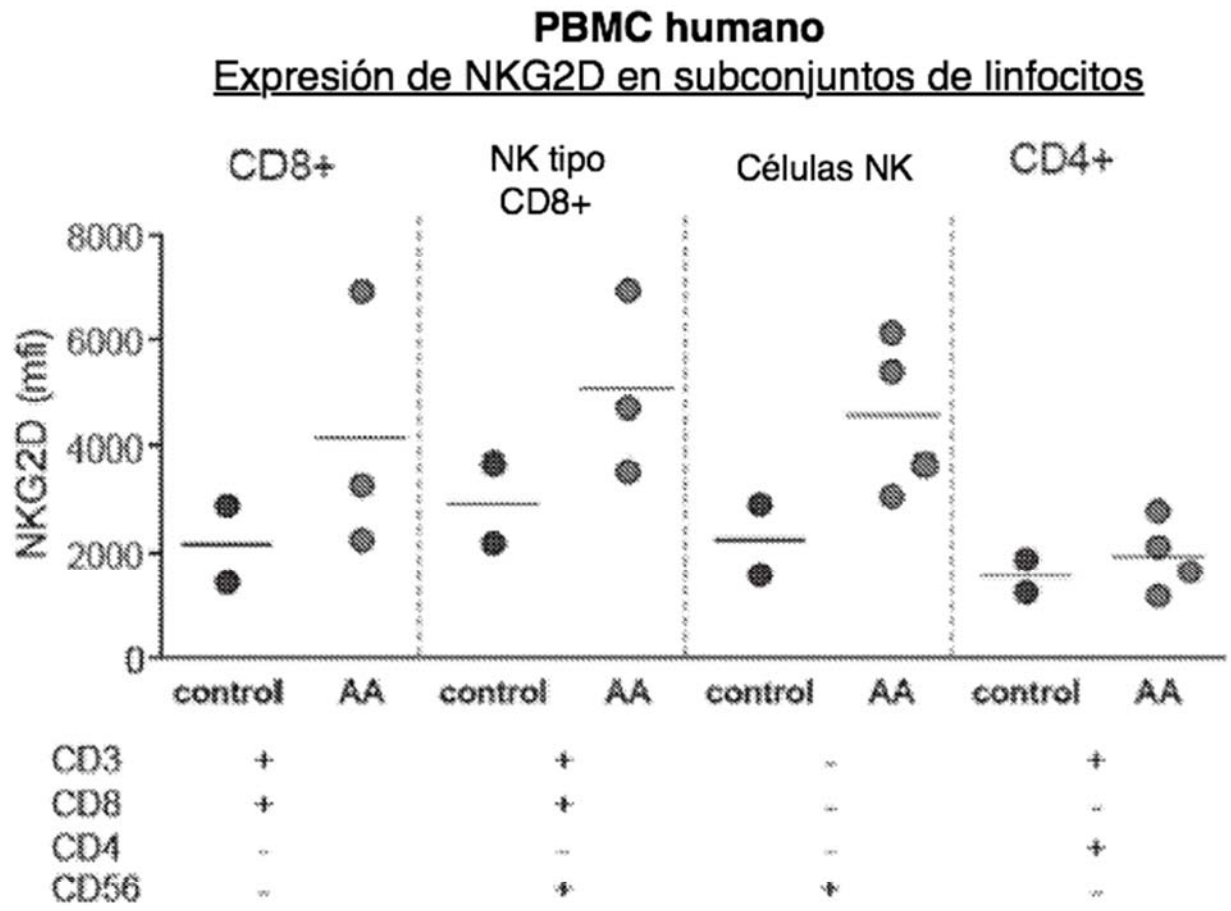


FIG. 26

piel

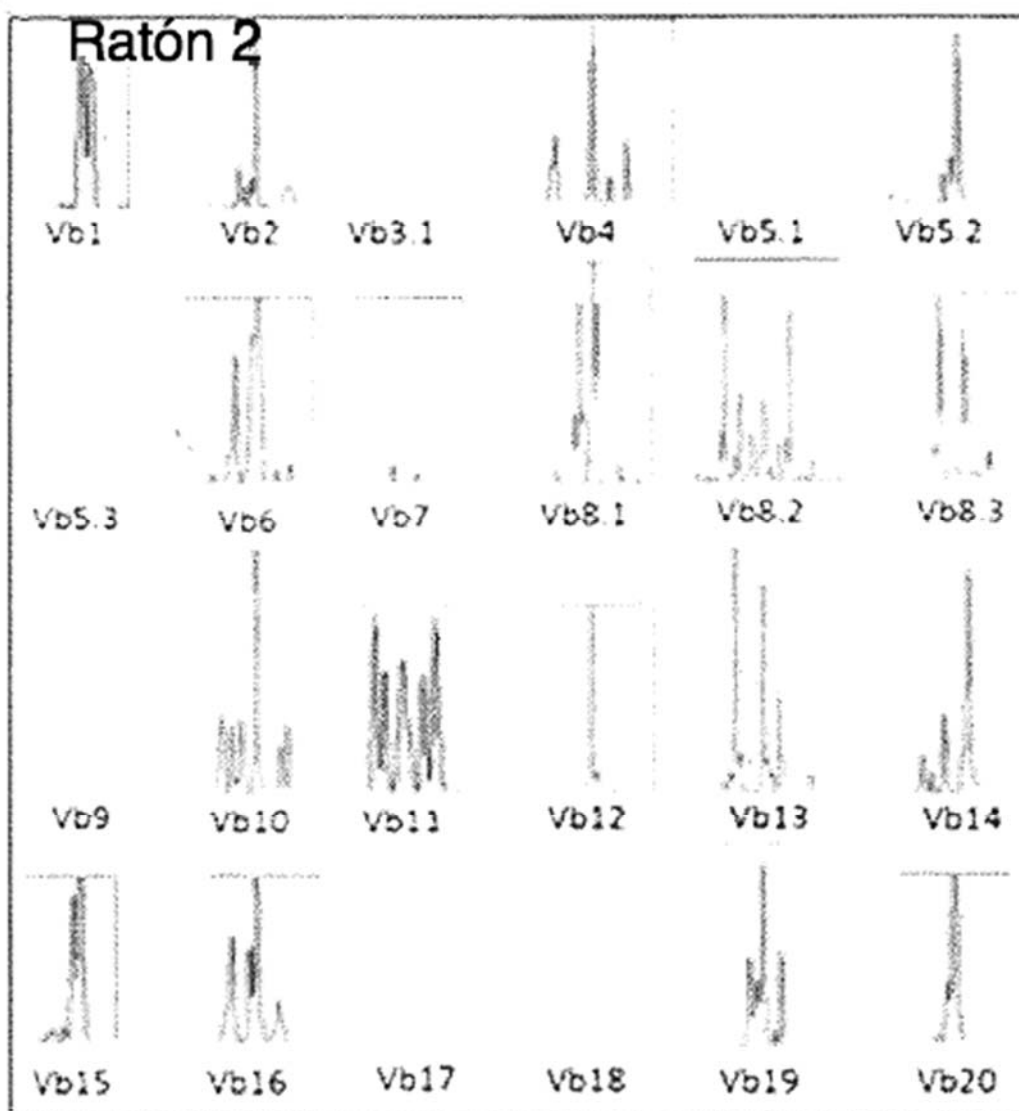


FIG. 27

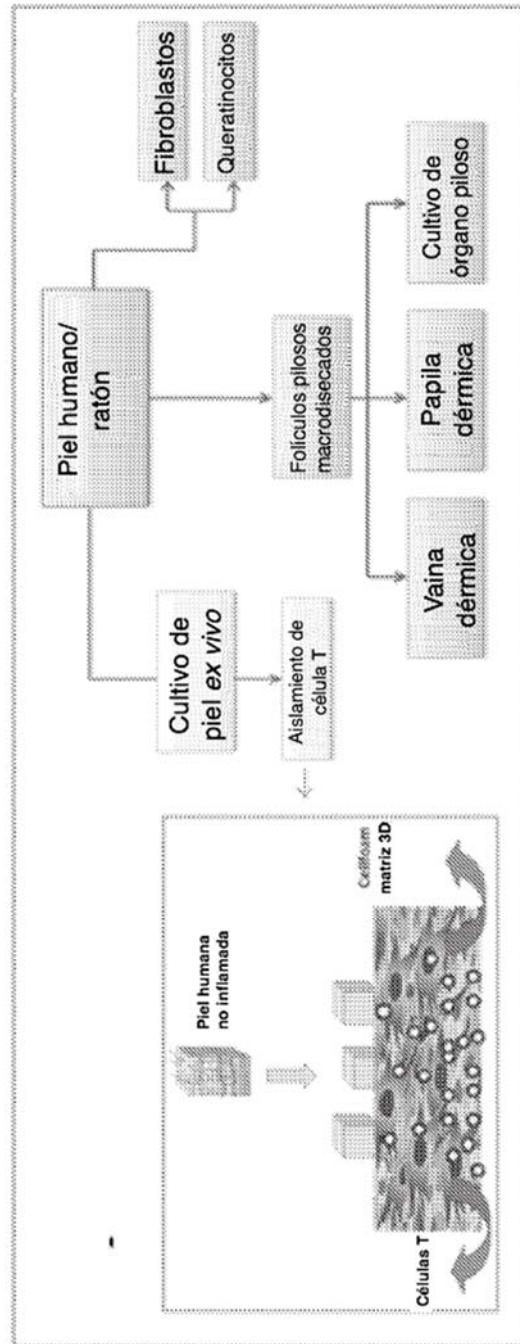
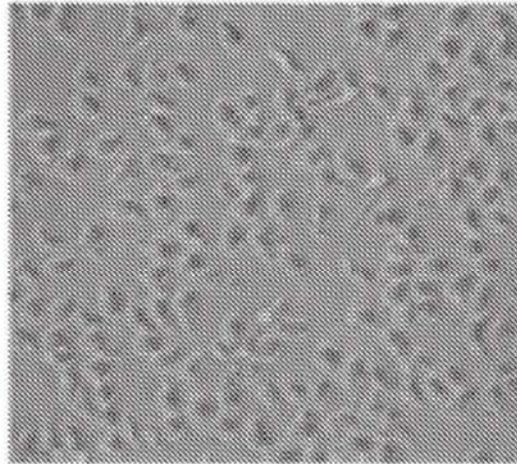


FIG. 28

A.



B. Células T de piel humana estimuladas con PMA/Ionomicina

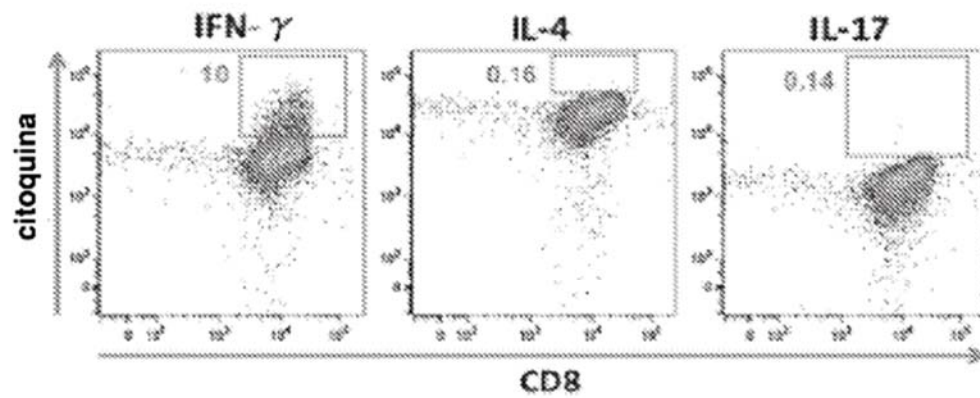
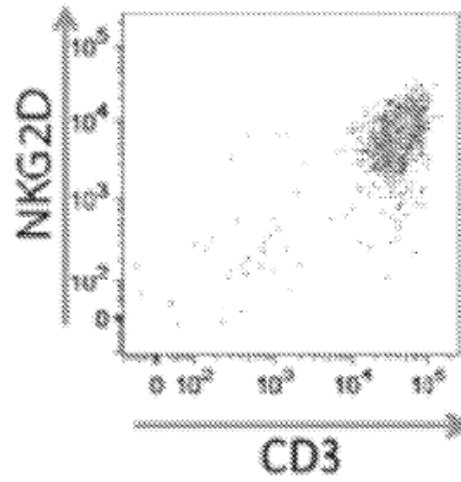


FIG. 29A-B

**C. Expresión de NKG2D
en células T de piel**



**D. A. Especificación de células T
de cultivo del paciente AA**

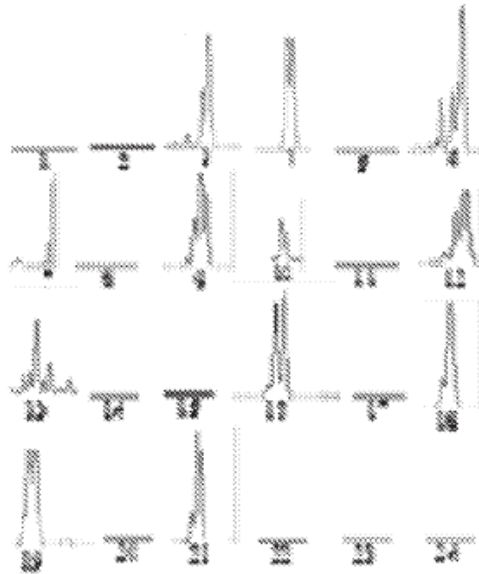


FIG. 29C-D

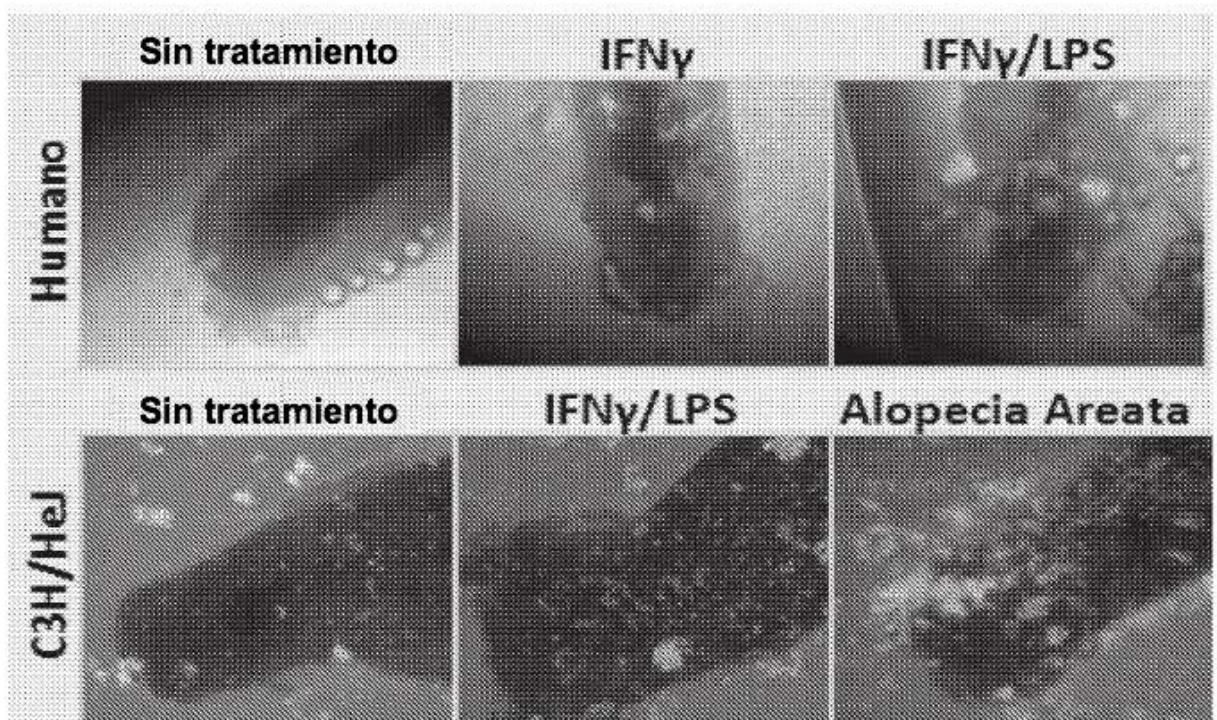


FIG. 30

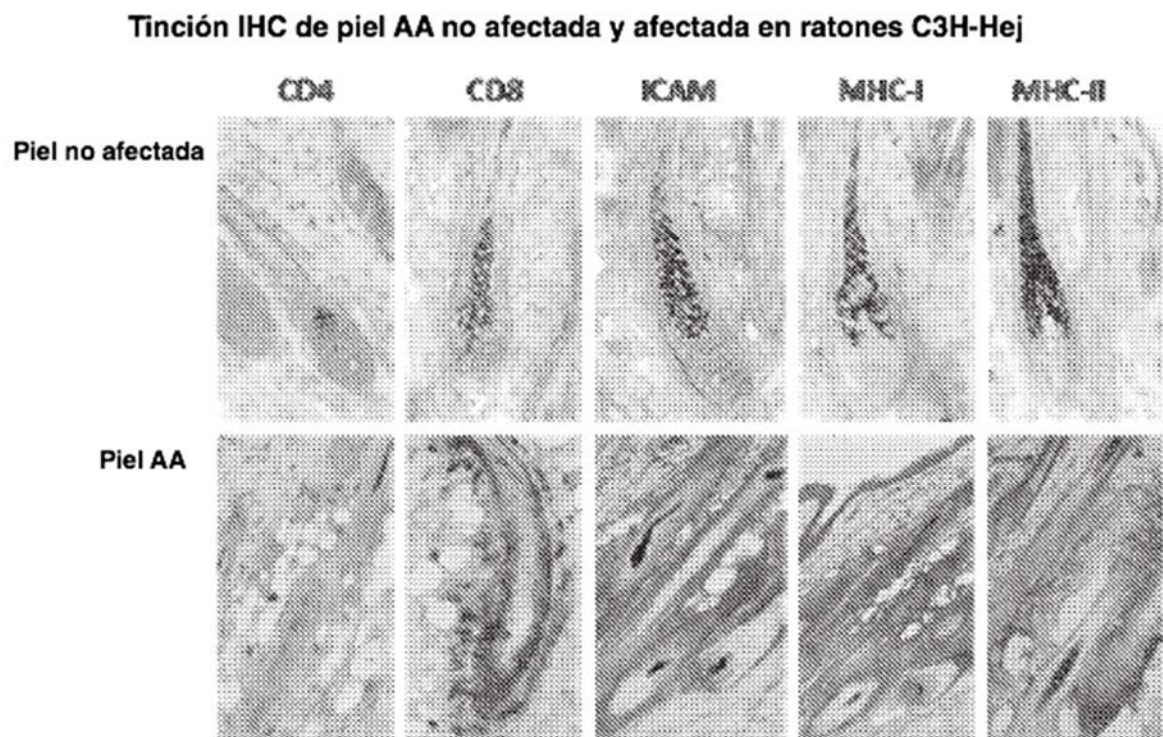


FIG. 31