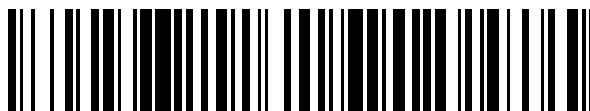


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 281**

51 Int. Cl.:

A61K 31/553

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2005** **E 05790718 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 1778224**

54 Título: **Inhibidores de FLT3 para la inmunosupresión**

30 Prioridad:

19.07.2004 US 589511 P

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

02.06.2014

73 Titular/es:

**THE JOHNS-HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 NORTH CHARLES STREET
BALTIMORE, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**SMALL, DONALD;
WHARTENBY, KATHERINE A. y
PARDOLL, DREW**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 464 281 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

Inhibidores de FLT3 para la inmunosupresión

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/589.511 de 19 de julio de 2004.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La invención se refiere a inhibidores de la quinasa FLT3 para suprimir una respuesta inmune de una célula, y prevenir o tratar trastornos inmunes relacionados. Terapias proporcionadas por la invención incluyen la administración de un inhibidor de tirosina quinasa relacionada con el FMS 3 (FLT3 – siglas en inglés) a un sujeto en necesidad del mismo, tal como un sujeto que padece un rechazo de órgano después del trasplante, rechazo de trasplante de médula ósea, enfermedad de injerto contra huésped, o lupus. Métodos para la detección de agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos inmunes tal como se describe en esta memoria incluyen el uso de un ratón que tiene un nivel elevado de la actividad del receptor FLT3.

ANTECEDENTES

20 Trastornos relacionados con el sistema inmunológico, especialmente el rechazo de órgano después del trasplante, la diabetes, la enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Graves y el lupus siguen siendo las enfermedades debilitantes que afectan a millones de personas en todo el mundo.

25 Trastornos relacionados con el sistema inmunológico pueden causar efectos secundarios potencialmente devastadoras e irreversibles para un individuo y se pueden producir, por ejemplo, como resultado de un sistema inmune incrementado. Trastornos relacionados con el sistema inmunológico tales como rechazo de trasplante de médula ósea, rechazo de órganos sólidos después del trasplante, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, enfermedad de Graves, anemia hemolítica, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP – siglas en inglés), esclerosis múltiple (MS – siglas en inglés), artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, diabetes mellitus tipo 1, miastenia grave y psoriasis son provocados por diversos de una sobre-actividad del sistema inmune. Las terapias actuales, que en su mayor parte actúan sobre el brazo de células T de la respuesta inmune resultan, a menudo, en una inmunosupresión grave.

30 El documento US 2002/0160974 describe el tratamiento de una enfermedad autoinmune mediante la administración de un antagonista de interferón en combinación con un antagonista de ligando de FLT3.

35 Por consiguiente, sería deseable disponer de nuevas terapias para el tratamiento de este tipo de indicaciones.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la invención proporcionan ahora inhibidores de la quinasa FLT3 para suprimir la respuesta inmune de una célula, tratando con ello trastornos relacionados con el sistema inmunológico. En particular, inhibiendo la señalización a través de tirosina quinasa relacionada con el FMS 3 (FLT3) FLT3 y se pueden tratar trastornos relacionados con FLT3, por ejemplo, disminuyendo el número de células dendríticas (DC – siglas en inglés) que se desarrollan *in vivo* y disminuyendo su capacidad de activar células T.

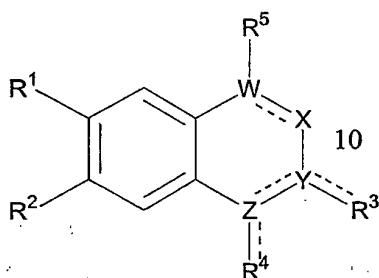
Se describen métodos de suprimir una respuesta inmune de una célula, que comprenden poner en contacto la célula con al menos un inhibidor de FLT3 que reduce la actividad de FLT3.

50 En determinadas formas la célula es una célula dendrítica, una célula NK, célula T, una célula B o una célula del sistema nervioso, por ejemplo una neurona, célula glial, oligodendrocito, célula de Schwann, astrocito, microglía. Ejemplos de neuronas incluyen, por ejemplo, una o más de una neurona aferente, neurona eferente, interneurona, neurona GABAérgica, neurona colinérgica, neurona dopaminérgica, neurona serotoninérgica, célula neuroendocrina, neuronas postmitóticas, neuronas embrionarias o células ganglionares en la retina.

Se reduce la actividad quinasa de FLT3. En una opción relacionada se reduce la actividad de autofosforilación de FLT3.

60 De acuerdo con un aspecto, el inhibidor de FLT3 se selecciona de uno o más de una molécula pequeña, un oligonucleótido anti-sentido, un anticuerpo anti-FLT3, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-FLT3, un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico que codifica un péptido, una molécula orgánica y cualquier combinación de los mismos. En una realización relacionada, la molécula pequeña se selecciona de uno o más de CEP701, AG 1296, AG 1295, CEP-5214, CEP-7055, PKC412, SU11248, SU5416, SU5614, MLN518, BAY43-9006, CHIR-258, amino-bencimidazol-quinolonas, Ki23819, estaurosporina.

En una realizacion adicional relacionada, la molécula pequeña es un compuesto de acuerdo con la fórmula 1:



(fórmula 1)

5

en donde:

W puede ser C, N, O;

X puede ser C, N, ausente;

Y puede ser C;

10

Z puede ser C, N;

y los grupos R pueden ser variantes sustituidas de:

R1 puede ser H, alcoxi, hidroxilo, alquilo heterocíclico/arilo;

R2 puede ser H, F, alcoxi, alquilo heterocíclico/arilo;

R3 puede ser H, O, arilo, heteroarilo, C(O)heteroarilo;

15

R4 puede ser H, alquilo, arilo, heteroarilo, CH-heteroarilo, ausente;

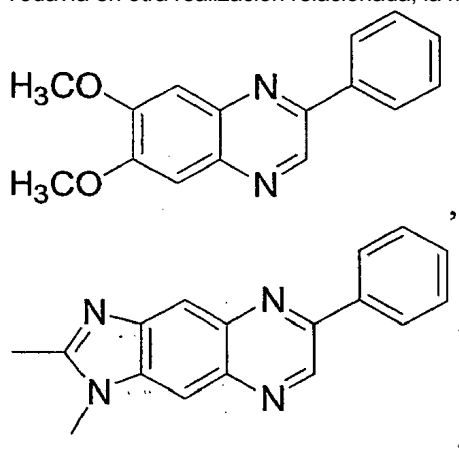
R5 puede ser H, arilo, heteroalquilo/arilo, ausente; e

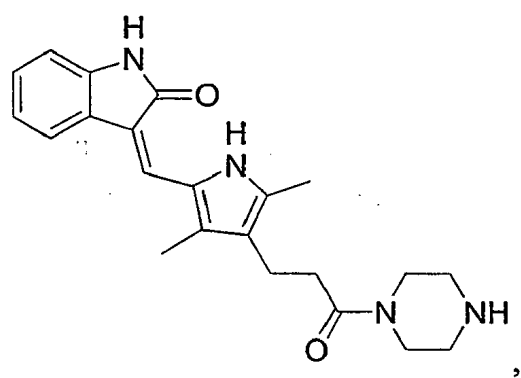
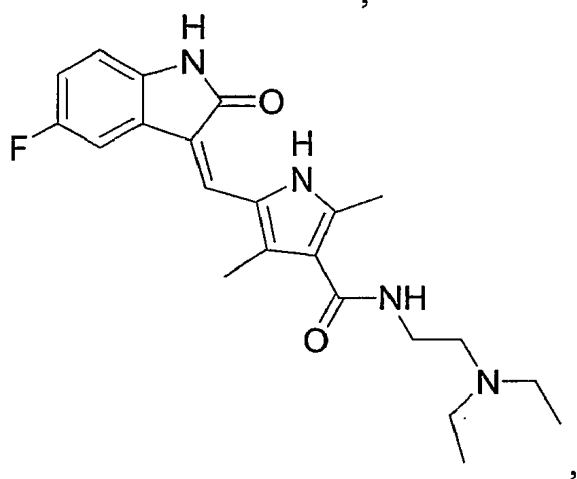
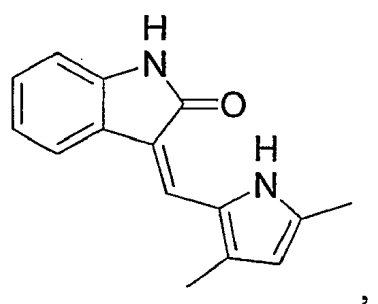
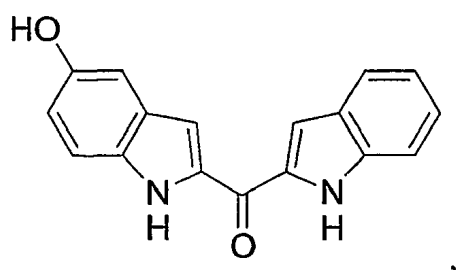
indicando las líneas discontinuas entre WX, WY, YZ, YR3 y ZR4 un doble enlace opcional, en donde el arilo,

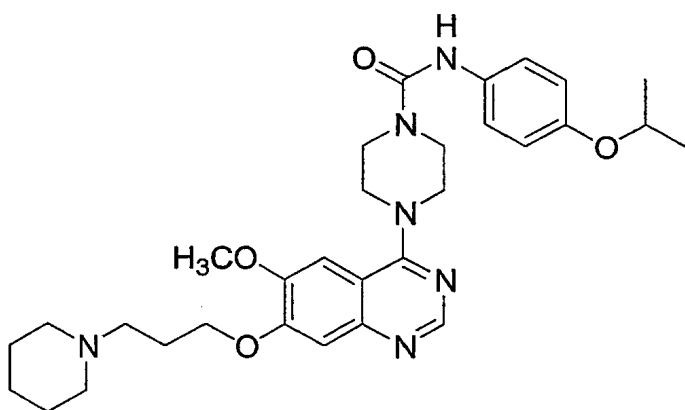
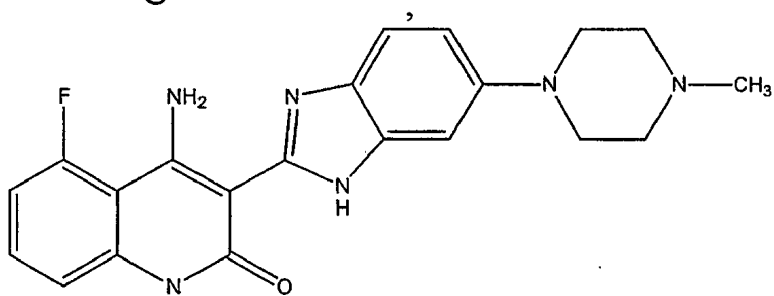
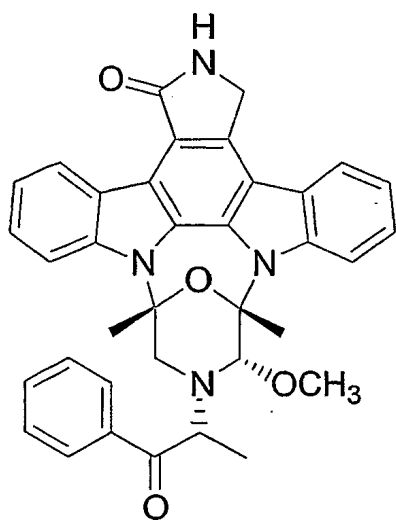
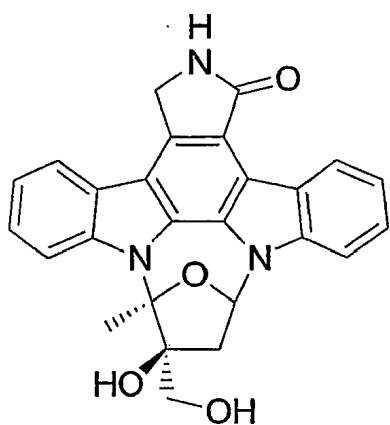
heteroarilo, alquilo heterocíclico/arilo están opcionalmente sustituidos.

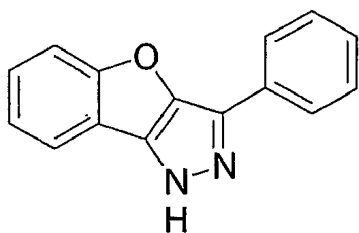
20

Todavía en otra realizacion relacionada, la molécula pequeña se selecciona de:









El anticuerpo se puede seleccionar de uno o más de IMC-EB10 e IMC-NC7. En una realización relacionada, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo primatizado y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el anticuerpo reconoce específicamente una forma fosforilada de FLT3. En otra realización, el anticuerpo reconoce específicamente una forma no fosforilada de FLT3.

En una realización relacionada, el oligonucleótido anti-sentido se selecciona de una o más de la secuencia de nucleótidos de la Figura 9 o un fragmento biológicamente activo de la misma.

En otra realización, el inhibidor de FLT3 reduce la transducción de señales dependiente de FLT3.

En una realización, el inhibidor de FLT3 regula a la baja la capacidad inmunoestimuladora de la célula.

Determinados métodos pueden comprender, además, administrar un inhibidor de células T con el inhibidor de FLT3.

Se proporcionan métodos de tratamiento de un trastorno FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 en un sujeto. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3 para reducir la actividad de FLT3.

Los métodos de tratamiento pueden comprender, además, identificar al sujeto que necesita tratamiento para un trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con y/o en donde el sujeto es tratado para el trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3.

En una opción el trastorno de o el trastorno relacionado con FLT3 es un trastorno relacionado con el sistema inmunológico.

En una opción relacionada, el trastorno relacionado con el sistema inmunológico es uno o más de rechazo de órganos, rechazo de trasplante de médula ósea, rechazo de trasplante de médula ósea no mieloablativo, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, granulomatosis de Wegener, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, y lupus, entre otras enfermedades autoinmunes. También se podría utilizar para mejorar el injerto de médula ósea después de regímenes de acondicionamiento no mieloablativo, y combinaciones de los mismos.

En una opción, el trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 es un trastorno neurológico.

En una opción relacionada, el trastorno neurológico es una o más de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo una enfermedad causada por una degeneración axonal. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, trastornos desmielinizantes tales como la esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; o panencefalitis esclerosante subaguda.

En una opción, el sujeto es un mamífero.

En otra opción, el mamífero es un ser humano, un primate, una rata, un perro, un gato o un ratón.

En una opción, el inhibidor de FLT3 se selecciona de uno o más de una molécula pequeña, un oligo-nucleótido anti-sentido, un anticuerpo anti-FLT3, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-FLT3, un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico que codifica un péptido, una molécula orgánica y cualquier combinación de los mismos.

En una opción, el oligonucleótido anti-sentido se selecciona de una o más de la secuencia de nucleótidos de la Figura 9 o fragmentos biológicamente activos de la misma.

En otra opción, el inhibidor de FLT3 reduce la actividad quinasas de FLT3 en el Sujeto.

- En una opción, el inhibidor de FLT3 reduce la actividad de autofosforilación de FLT3 en el sujeto.
- En una opción, el inhibidor de FLT3 reduce la transducción de la señal dependiente de FLT3 en el sujeto.
- 5 En otra opción el inhibidor de FLT3 regula a la baja la capacidad inmunoestimuladora del sujeto.
- En una realización, se proporciona administrar además un inhibidor de las células T con el inhibidor de FLT3.
- 10 La Invención proporciona métodos de tratar un trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3 para reducir la transducción de señales dependiente de FLT3.
- 15 También se proporcionan en esta memoria animales transgénicos no humanos que tienen un receptor de FLT3 constitutivamente activado. En una realización, el animal transgénico es un ratón.
- En otra opción, el animal transgénico se utiliza para someter a ensayo agentes terapéuticos y/o como un modelo para trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 20 También se proporcionan métodos para rastrear un agente terapéutico para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, que comprende administrar el agente a un ratón que tiene un nivel elevado de la actividad del receptor FLT3, y medir un cambio en la respuesta inmune, en donde una disminución en la respuesta inmune indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 25 En una forma, el cambio en la respuesta inmune es un número disminuido de células DC. En una forma relacionada, el cambio en la respuesta inmune es un número disminuido de células NK. En otra forma relacionada, se mide el cambio en la respuesta inmune determinando el nivel de proteína coestimuladora de DC, en donde un aumento en el nivel de proteína coestimuladora de DC indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 30 En una forma, la proteína coestimuladora de DC es B7-DC. En una forma, se mide el cambio en la respuesta inmune mediante un ensayo de proliferación de células T, en el que una disminución de la proliferación de células T indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 35 Se proporcionan en esta memoria métodos para rastrear un agente terapéutico para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, que comprende administrar un agente terapéutico a células eucarióticas, y medir un cambio en la respuesta inmune en la célula, en donde una disminución en la respuesta inmune de la célula indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 40 En una forma, la célula se selecciona de una o más de: células dendríticas, células NK, células del bazo, células T y mezclas de las mismas. En otra forma, la disminución en la respuesta inmune de la célula se mide determinando el nivel de proteína coestimuladora de DC, en donde un aumento en el nivel de proteína coestimuladora DC indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 45 En otra forma, la proteína coestimuladora de DC es B7-DC.
- En otra forma, se mide el cambio en la respuesta inmune determinando la proliferación de células T, en donde una disminución de la proliferación de células T indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 50 Se proporcionan métodos para rastrear un agente terapéutico para tratar un trastorno neurológico, que comprende administrar el agente a un ratón que ha sido inmunizado con un péptido MOG, y visualizar las neuronas, en donde una modulación en los axones indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.
- 55 En una forma, el cambio en los axones es una disminución en el número de axones degenerantes.
- En otra forma, la visualización es por examen microscópico.
- 60 Se proporcionan en esta memoria métodos para rastrear un agente terapéutico para tratar un trastorno neurológico, que comprende administrar un agente terapéutico a células neuronales, y medir un cambio en las células, en donde una disminución en el número de neuronas degenerantes indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos neuronales.

Métodos de tratamiento incluyen tratar trastornos relacionados con el sistema inmunológico, que incluyen administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidor de FLT3 para reducir la actividad de FLT3. Los métodos de tratamiento incluyen administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3 para reducir la transducción de señales dependiente de FLT3. Los métodos de tratamiento incluyen también la ruptura de la tolerancia en el contexto de vacunas tumorales.

Métodos de tratamiento incluyen la administración a un sujeto que necesite este tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos que pueden inhibir la señalización de FLT3 a un animal, incluido un mamífero, particularmente un ser humano. Preferiblemente, se identifica y/o selecciona un sujeto que es susceptible a o que padece un trastorno relacionado con el sistema inmunológico y luego se administran uno o más compuestos inhibidores de FLT3 a los sujetos identificados y/o seleccionados.

Métodos de rastreo de agentes terapéuticos para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunológico incluyen administrar un agente a un mamífero tal como un ratón u otro sujeto, que tiene niveles elevados de actividad de FLT3 y medir la respuesta inmune. Métodos de rastrear agentes terapéuticos para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunológico incluyen administrar un agente a una célula y medir la respuesta inmune.

Otros aspectos de la Invención se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A representa el tratamiento de DCs con el inhibidor de FLT3 CEP-701. Se muestran los resultados de las DCs incubados en un análisis de dosis-respuesta a CEP 701 a concentraciones de 0,5 ó 50 nM. Los tres gráficos superiores muestran células estimuladas con GM-CSF y los tres inferiores muestran células estimuladas con GM-CSF y ligando de FLT3 (FL). Resultados de la inhibición de FLT3 en la inducción de la apoptosis en una fracción significativa de las DCs. La Figura 1b representa los resultados de tratar DCs con el inhibidor de FLT3 AG 1296 a 0,1 y 10 μ M y de analizar la apoptosis. La inhibición de FLT3 resulta en la inducción de la apoptosis en una fracción significativa de las DCs. La Figura 1c representa un análisis de la transferencia Northern de células de médula ósea humana tratadas con FL e IL-4 o GM-CSF. La transferencia Northern se hizo para hB7-DC y la beta-actina. Esto demuestra que la adición de FL supra-regula en gran medida la expresión de B7-DC (GM-CSF solo no mostró expresión alguna; datos no mostrados).

Las Figuras 2a y 2b representan los resultados de la inhibición de FLT3 en esplenocitos DC y BALB/c basada en la proliferación de células T. DCs fueron tratadas con CEP701 (o no como control) y luego se extendieron en placas con esplenocitos C57BL/6 en las relaciones que se muestran. Después de 3 días, se añadió ^{3} H, y se determinó la proliferación. CEP701 tiene un potente efecto sobre la disminución de la proliferación de células T. En la Figura 2b, los esplenocitos BALB/c fueron sustituidos por las DCs para someter a ensayo la inhibición de CEP701 en una reacción mixta de linfocitos estándar (MLR). Como demuestra la Figura, esta respuesta también fue inhibida en presencia de CEP701. La Figura 2c representa el resultado de la inhibición de esplenocitos BALB/c por parte del inhibidor de FLT3 AG1296.

La Figura 3 representa gráficamente el tratamiento directo de células T con el inhibidor de FLT3 CEP-701 después de la estimulación con el anticuerpo anti-CD28. Tal como se muestra, este tratamiento no inhibe su proliferación.

Las Figuras 4a y 4b representan gráficamente el resultado en poblaciones de células inmunes de tratamiento de ratones con el inhibidor de FLT3 CEP701, lo cual disminuye las poblaciones de células CD11c y NK, pero no las poblaciones de células CD3 o B220.

La figura 5 representa gráficamente el tratamiento de ratones con el inhibidor de FLT3 CEP 701, lo que disminuye una respuesta inmune autorreactiva in vivo, demostrando que la inhibición de DCs es suficiente para regular a la baja una respuesta inmune.

La figura 6 representa el tratamiento de DCs con AG1296, a 0, 1 ó 10 μ M y luego se analizaron para la expresión de moléculas coestimuladoras B7.2 (CD 86) y B7-DC. Tal como se muestra, ambas moléculas co-estimuladoras fueron reguladas a la baja en presencia de AG1296.

La figura 7 representa gráficamente que la estimulación por DC de células T es inhibida por parte de AG1296.

La Figura 8 representa gráficamente que el tratamiento con inhibidores de FLT3 mejora la encefalitis autoinmune experimental establecida (EAE – siglas en inglés).

La Figura 9 es la secuencia completa y predicha de aminoácidos de ADNc de STK-1. Los aminoácidos están numerados a la izquierda de cada una de las columnas y los nucleótidos están numerados a la derecha. Subrayado está el péptido señal predicho (aa 1-23), seguido del sitio de escisión probable marcado con una flecha.

La Figura 10 muestra el número de fibras axonales degenerantes en la zona del campo definida por las secciones de ratones tratados con CEP-701 en comparación con ratones de control de vehículo a los 210 días después de la inducción de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se ha establecido antes y se demuestra en los ejemplos que siguen, se ha encontrado ahora que la inhibición de FLT3 puede ser eficaz para tratar trastornos relacionados con el sistema inmunológico, incluyendo el rechazo de órganos, rechazo de trasplante de médula ósea, rechazo de trasplante de médula ósea no mieloablativo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad de Graves, anemia hemolítica, granulomatosis de Wegener, hipogammaglobulinemia, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, lupus y cualquier combinación de los mismos.

FLT3 es un receptor tirosina quinasa que se expresa preferiblemente en células progenitoras hematopoyéticas. (Small et al., Blood 15(4): 1110-9 (1993)). La señalización a través del receptor FLT3 juega un papel importante en las células dendríticas (DC) tal como se evidencia por los números crecientes de DCs tras la estimulación de con su ligando, el Ligando FLT3 (FL). La señalización a través de FLT3 se sabe que afecta a células madre hematopoyéticas y progenitoras. Inhibidores de FLT3 pueden suprimir la señalización aguas abajo a través de FLT3, lo cual parece ser importante para el desarrollo de células T, células NK y células B. Sorprendentemente, se ha encontrado que la inhibición de la señalización de FLT3 conduce a una disminución en el número de DCs e interfiere con la capacidad de los DCs de presentar el antígeno para activar células T. FLT3 requiere señalizar su dominio de tirosina quinasa, por lo tanto, un método para inhibir la señalización de FLT3 consiste en inhibir esta actividad enzimática. La estimulación con FL de FLT3 también estimula enormemente el desarrollo de células NK y linfocitos B, que también son importantes para el sistema inmunológico y, así, la inhibición de la señalización de FLT3 también tendría el efecto de la supresión de estas células.

FLT3 se expresa en progenitores de DC, y la señalización de FL/FLT3 resulta en grandes aumentos en los números de DCs en la médula ósea (BM – siglas en inglés), bazo, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal, hígado, pulmón, cavidad peritoneal y la piel. Por ejemplo, véase S.D. Lyman, Curr Opin Hematol 5, 192-6, (1998); H.J. McKenna, K. L. et al., Blood 95, 3489-97, (2000); E. Maraskovsky, et al., J Exp Med 184, 1953-1962, (1996), DCs estimuladas con FL son funcionales en ratones y seres humanos; M.R. Shurin, et al., Cell Immunol 179, 174-84, (1997); y E. Maraskovsky, et al., Blood 96, 878-84, (2000), GM-CSF también estimula la producción de DC. Aunque GM-CSF o FL aumenta drásticamente las DCs in vivo, el fenotipo de las DCs generadas parece ser algo diferente, sugiriendo que estas citoquinas pueden activar diferentes vías en las DCs. Por ejemplo, véase E. Daro, et al., J Immunol 165, 49-58, (2000); K. Brasel, et al., Blood 96, 3029-39, (2000); P. Bjorck, Blood 98, 3520-6, (2001); y P.J. O'Connell, et al., J Immunol 165, 795-803, (2000). En particular, parece que FL expande subconjuntos de DC tanto CD11b+/CD11c+ (mieloide) como CD11b-/CD11c+ (linfoide), mientras que GM-CSF expande principalmente DCs CD11b-/CD11c+.

Tras la unión del ligando a HSCs normales, FLT3 se homodimeriza y su dominio quinasa se activa. La activación de la quinasa FLT3 tiene varias consecuencias. FLT3 fosforila directamente un cierto número de proteínas sustrato en residuos de tirosina, lo cual, a su vez, activa estas proteínas. Además, FLT3 se fosforila por sí mismo en varios residuos de tirosina, y estos residuos son entonces unidos por un cierto número de proteínas adaptadoras que contienen dominios SH2. Las proteínas que han demostrado estar involucradas en la señalización de FLT3 incluyen la subunidad p85 de la quinasa PI-3, PLCy, VAV, CBL, CRKL, Gab1 y 2, SHP2, SHIP, SHC y STAT5. El resultado final es la transducción de señales que actúan sobre el núcleo para alterar el programa genético de la célula. Algunas de estas señales estimulan la proliferación, mientras que otras parecen proteger a la célula frente a la apoptosis o la diferenciación de impulsión.

Los autores de la invención han encontrado, particularmente, que los inhibidores de moléculas pequeñas de FLT3, por ejemplo CEP701, AG 1296, AG 1295 y CEP-5214 pueden suprimir la respuesta inmune a través de la señalización de FLT3. También han encontrado que anticuerpos anti-FLT3 inhiben la señalización de FLT3 inhibiendo la activación del receptor, y moléculas antisentido de FLT3 también previenen la expresión de FLT3 y, por lo tanto, inhiben una respuesta inmune a través de FLT3.

Un método para suprimir una respuesta inmune de una célula comprende proporcionar una población de células eucarióticas y poner en contacto las células con al menos un inhibidor de FLT3 que reduce la actividad de FLT3. Tal como se utiliza en esta memoria, la actividad de FLT3 puede aludir a su actividad quinasa, a su capacidad de transmitir señales aguas abajo, a su actividad de autofosforilación, y similares.

El término "administración" o "administrar" incluye vías de introducir el compuesto de la o las invenciones a un sujeto para llevar a cabo su función prevista. Ejemplos de vías de administración que pueden utilizarse incluyen la inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal), oral, por inhalación, rectal y transdermal. Los

preparados farmacéuticos se pueden administrar mediante formas adecuadas para cada una de las vías de administración. Por ejemplo, estos preparados se administran en forma de comprimidos o cápsulas, por inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, etc. administración por inyección, infusión o inhalación; tópica mediante loción o ungüento; y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración por vía oral. La inyección puede ser en bolo o infusión continua. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto de la invención se puede recubrir con o disponer en un material seleccionado para protegerlo de las condiciones naturales que pueden afectar perjudicialmente a su capacidad de realizar su función prevista. El compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con otro agente según se describe antes o con un soporte farmacéuticamente aceptable, o ambos. El compuesto de la invención se puede administrar antes de la administración del otro agente, simultáneamente con el agente o después de la administración del agente. Además, el compuesto de la invención también se puede administrar en una proforma que se convierte en su metabolito activo, o metabolito más activo in vivo.

El término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluidos grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. El término alquilo incluye, además, grupos alquilo que pueden incluir, además, átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo que reemplazan a uno o más carbonos de la cadena principal hidrocarbonada, p. ej. átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo. En realizaciones preferidas, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su estructura (p. ej., C1-C30 para la cadena lineal, C3-C30 para la cadena ramificada), preferiblemente 26 o menos, y más preferiblemente 20 o menos, y aún más preferiblemente 4 o menos. Del mismo modo, cicloalquilo preferido tienen de 3-10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y más preferiblemente tienen 3, 4, 5, 6 ó 7 carbonos en la estructura de anillo.

Además de ello, el término alquilo, tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva y frases pretende incluir tanto "alquilo no sustituidos" como "alquilo sustituidos", refiriéndose estos últimos a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal hidrocarbonada. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluidos alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluidos alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Se entenderá por parte de los expertos en la técnica que los restos sustituidos en la cadena hidrocarbonada pueden estar sustituidos por sí mismos, si es apropiado. Los cicloalquilo pueden estar sustituidos, además, p. ej., con los sustituyentes descritos anteriormente. Un resto "alquilarilo" es un alquilo sustituido con un arilo (p. ej., fenilmetilo (bencilo)). El término "alquilo" también incluye grupos alifáticos insaturados análogos en longitud y en la posible sustitución a los alquilo descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente.

A menos que se especifique de otro modo el número de carbonos, "alquilo inferior", tal como se utiliza en esta memoria, significa un grupo alquilo, tal como se define anteriormente, pero que tiene de uno a diez carbonos, más preferiblemente de uno a seis, y aún más preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono en su estructura de la cadena principal, que puede ser de cadena lineal o ramificada. Ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, terc.-butilo, hexilo, heptilo, octilo, etcétera. En una realización preferida, la expresión "alquilo inferior" incluye un alquilo de cadena lineal que tiene 4 o menos átomos de carbono en su cadena principal, p. ej. alquilo C1-C4.

Los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a grupos alifáticos insaturados análogos en longitud y posible sustitución a los alquilo descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente. Por ejemplo, la invención contempla grupos ciano y propargilo.

El término "arilo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al radical de grupos arilo, incluyendo grupos aromáticos de un solo anillo de 5 y 6 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, benzoxazol, benzotiazol, triazol, tetrazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Grupos arilo incluyen también grupos aromáticos policíclicos fusionados tales como naftilo, quinolilo, indolilo, y similares. A esos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también se les puede aludir como "heterociclos de arilo", "heteroarilos" o "compuestos heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente tal como, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluidos alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluidos alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también pueden estar condensados o puenteados con anillos alíclicos o heterocíclicos no son aromáticos con el fin de formar un policiclo (p. ej., tetralina).

La expresión "actividades biológicas" de un compuesto de la invención incluye todas las actividades producidas por el

compuesto de la invención en una célula sensible. Incluye actividades genómicas y no genómicas provocadas por estos compuestos.

"Composición biológica" o "muestra biológica" se refiere a una composición que contiene o que se deriva de células o biopolímeros. Composiciones que contienen células incluyen, por ejemplo, la sangre de mamíferos, los concentrados de glóbulos rojos, concentrados de plaquetas, concentrados de leucocitos, proteínas de las células de la sangre, plasma sanguíneo, plasma rico en plaquetas, un concentrado de plasma, un precipitado de cualquier fraccionamiento del plasma, un sobrenadante de cualquier fraccionamiento del plasma, fracciones de proteínas del plasma sanguíneo, proteínas de la sangre purificada o parcialmente purificada u otros componentes, suero, semen, calostro de mamíferos, leche, saliva, extractos de placenta, un crioprecipitado, un criosobrenadante, un lisado de células, un cultivo de células de mamífero o medio de cultivo, productos de fermentación, fluido de ascitis, proteínas inducidas en células de la sangre y productos producidos en cultivo celular por parte de células normales o transformadas (p. ej., a través de tecnología de ADN recombinante o tecnología de anticuerpos monoclonales). Composiciones biológicas pueden estar libres de células. En una forma preferida, una composición biológica o muestra biológica adecuada es una suspensión de glóbulos rojos. En algunas formas, la suspensión de células de sangre incluye células de la sangre de mamíferos. Preferiblemente, las células de la sangre se obtienen de un ser humano, un primate no humano, un perro, un gato, un caballo, una vaca, una cabra, una oveja o un cerdo. En formas preferidas, la suspensión de células de la sangre incluye glóbulos rojos y/o plaquetas y/o leucocitos y/o células de la médula ósea.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del participante en la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre el participante en la imagen especular.

El término "diastereómeros" se refiere a estereoisómeros con dos o mas centros de disimetría y cuyas moléculas no son imágenes especulares una de otra.

La expresión "cantidad eficaz" incluye una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado, p. ej. suficiente para tratar un trastorno de FLT3 o trastorno relacionado con FLT3. Una cantidad eficaz de compuesto de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto de la invención de provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz también es una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales (p. ej. efectos secundarios) del compuesto de la invención son superados los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Tal como se utiliza en esta memoria, trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 se refiere a cualquier trastorno o afección que se relaciona con, es provocado ya sea directa o indirectamente por FLT3. Trastornos de FLT3 y trastornos relacionados incluyen, por ejemplo, trastornos relacionados con el sistema inmunológico y trastornos neurodegenerativos. Trastornos relacionados con el sistema inmunológico incluyen, por ejemplo, que el trastorno relacionado con el sistema inmunológico se selecciona de uno o más de rechazo de órganos, rechazo de trasplante de médula ósea, rechazo de trasplante de médula ósea no mieloablatoivo, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, granulomatosis de Wegener, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis y lupus, entre otras enfermedades autoinmunes. También podría utilizarse para mejorar el injerto de médula ósea después de regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, y combinaciones de los mismos. Trastornos neurodegenerativos incluyen, por ejemplo, trastornos de degeneración axonal, incluida, por ejemplo esclerosis múltiple, trastornos del núcleo desmielinizantes tales como esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; y trastornos de la unidad motriz tales como la esclerosis amiotrófica lateral, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; o panencefalitis esclerosante subaguda.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de la invención (es decir, una dosificación eficaz) puede variar de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso del peso corporal, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg o 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen pero no se limitan a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de la un compuesto de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo, el sujeto es tratado con un compuesto de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. También se apreciará que la dosificación eficaz de la un compuesto de la invención utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más

- pequeñas, queson menores que la dosis óptima del compuesto. Después de ello, la dosificación se puede aumentar en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea. Es de esperar que una cantidad terapéuticamente eficaz y una cantidad antiviral profilácticamente eficaz de un compuesto de la invención varíe de aproximadamente 0,1 miligramo por kilogramo de peso corporal por día (mg/kg/día) a aproximadamente 100 mg/kg/día.
- Tal como se utiliza en esta memoria, "obtener una muestra biológica de un sujeto" incluye obtener una muestra para uso en los métodos descritos en esta memoria. Una muestra biológica se describe anteriormente.
- Tal como se utiliza en esta memoria, identificar un sujeto que lo necesite puede hacerse por auto-identificación o mediante diagnóstico de un profesional de la salud.
- Tal como se utiliza en esta memoria, un sujeto que lo necesite es un sujeto que necesite tratamiento profiláctico de un trastorno relacionado con FLT3 o a quine se le ha diagnosticado un trastorno relacionado con FLT3.
- El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre si. Una mezcla equimolar de dos enantiómeros se denomina una "mezcla racémica" o un "racemato".
- El término "haloalquilo" pretende incluir grupos alquilo tal como se definen anteriormente que están mono-, di- o poli-sustituidos con halógeno, p. ej. fluorometilo y trifluorometilo.
- El término "halógeno" designa -F, -Cl, -Br o -I.
- El término "hidroxilo" significa -OH.
- El término "heteroátomo", tal como se utiliza en esta memoria, significa un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Heteroátomos preferidos son nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.
- El término "homeostasis" está reconocido en la técnica para dar a entender el mantenimiento de las condiciones estáticas o constantes, en un entorno interno.
- La expresión "propiedades biológicas mejoradas" se refiere a cualquier actividad inherente en un compuesto de la invención que mejora su eficacia in vivo. En una realización preferida, esta expresión se refiere a cualquier propiedad cualitativa o cuantitativa terapéutica mejorada de un compuesto de la invención, tal como toxicidad reducida, p. ej. actividad hipercalcémica reducida.
- La expresión "opcionalmente sustituido" pretende abarcar grupos que no están sustituidos o que están sustituidos con distinto de hidrógeno en una o más posiciones disponibles, típicamente 1, 2, 3, 4 ó 5 posiciones, con uno o más grupos adecuados (que pueden ser los mismos o diferentes). Tales sustituyentes opcionales incluyen, por ejemplo, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo C1-C8, alqueno C2-C8, alqueno C2-C8, alcoxi C1-C8, alquil C2-C8-éter, alcanona C3-C8, alquilotio C1-C8, amino, mono- o di-(alquil C1-C8)amino, haloalquilo C1-C8, haloalcoxi C1-C8, alcanol C1-C8, alcanoloxi C2-C8, alcoxi C1-C8-carbonilo, -COOH, -CONH2, mono- o di-(alquil C1-C8)aminocarbonilo, -SO2NH2 y/o mono- o di-(alquil C1-C8)sulfonamido, así como grupos carbocíclicos y heterocíclicos. La sustitución opcional se indica también por la frase "sustituido con 0 a x sustituyentes", en donde x es el número máximo de posibles sustituyentes. Determinados grupos opcionalmente sustituidos están sustituidos con 0 a 2, 3 ó 4 sustituyentes seleccionados independientemente (es decir, no están sustituidos o están sustituidos con hasta el número máximo citado de sustituyentes).
- El término "heterocicloalquilo" se refiere a un sistema de anillos tricíclico no aromático, completamente saturado, monocíclico de 3-9 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que comprende 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionándose dichos heteroátomos entre O, N, S, B, P o Si. Los grupos heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. En una realización, 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de cada uno de los anillos de un grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos con un sustituyente. Grupos heterocicloalquilo representativos incluyen piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 4-piperidonilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidrotiopiranilo-sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo-sulfóxido, tiomorfolinilo-sulfona, 1,3-dioxolano, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tiireno.
- El término "isómeros" o "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio. Los compuestos en esta memoria pretenden incluir todos los isómeros y estereoisómeros.
- El término "modular" se refiere a aumentos o disminuciones en la actividad de una célula en respuesta a la exposición

de un compuesto de la invención, p. ej. la inhibición de la proliferación y/o inducción de la diferenciación de al menos una sub-población de células en un animal de tal manera que se consiga un resultado final deseado, p. ej. un resultado terapéutico. En realizaciones preferidas esta frase pretende incluir las infecciones virales de las células.

- 5 El término "obtener" tal como en "obtener el inhibidor de FLT3" no pretende incluir la compra, síntesis o la adquisición de otro modo del inhibidor.

10 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se utilizan en esta memoria, significan modos de administración distintos de la administración por vía enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e inyección e infusión intraesternal.

15 El término "profármaco" incluye compuestos con restos que pueden ser metabolizados in vivo. Generalmente, los profármacos son metabolizados in vivo mediante esterasas o mediante otros mecanismos para formar fármacos activos. Ejemplos de profármacos y sus usos son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los profármacos se pueden preparar in situ durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente de esterificación adecuado. Los grupos hidroxilo se pueden convertir en ésteres mediante tratamiento con un ácido carboxílico. Ejemplos de restos de profármaco incluyen restos éster de alquilo inferior sustituidos y no sustituidos, ramificados o no ramificados (p. ej. ésteres del ácido propiónico), ésteres de alquenilo inferior, ésteres de di-alquil inferior-amino-alquilo inferior (p. ej. éster dimetilaminoetilico), ésteres de acilamino-alquilo inferior (p. ej. éster acetiloximetílico), ésteres de aciloxi-alquilo inferior (p. ej. éster pivaloiloximetílico), ésteres de arilo (éster fenílico), ésteres de arilo-alquilo inferior (p. ej. éster bencílico), ésteres de arilo y aril-alquilo inferior sustituidos (p. ej. con metilo, halo o sustituyentes metoxi), amidas, alquil inferior-amidas, di-alquil inferior-amidas e hidroxí-amidas. Restos de profármacos preferidos son ésteres del ácido propiónico y ésteres de acilo. También se incluyen profármacos que se convierten en formas activas a través de otros mecanismos in vivo.

30 La expresión "una cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención, incluidos los de la fórmula (I) o descritos en esta memoria de otro modo, que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, para la prevención o el tratamiento de un trastorno relacionado con FLT3.

La expresión "toxicidad reducida" pretende incluir una reducción de cualquier efecto secundario no deseado provocado por un compuesto de la invención cuando se administra in vivo, p. ej., una reducción en la actividad hipercalcémica.

35 El término "sulfhidrido" o "tiol" significa -SH.

El término "sujeto" incluye organismos que son capaces de padecer un trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 o que de otra manera podría beneficiarse de la administración de un compuesto de la invención, tales como animales humanos y no humanos. Animales humanos preferidos incluyen pacientes humanos que padecen o son propensos a padecer un trastorno de FLT3, un trastorno relacionado con FLT3 o un estado asociado, tal como se describe en esta memoria. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, p. ej. mamíferos, p. ej. roedores, p. ej. ratones, y no mamíferos, tales como primates no humanos, p. ej. ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. susceptibles a un trastorno de FLT3 o trastorno relacionado con FLT3, es decir, sujetos con riesgo de desarrollar un trastorno de FLT3 o trastorno relacionado con FLT3, es decir, sujetos que padecen una supresión del sistema inmunológico.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "sustituyente" o "sustituido" significa que un radical hidrógeno en un compuesto o grupo (tal como, por ejemplo, grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, ciclilo, heterocicloalquilo o heterociclilo) está reemplazado con cualquier grupo deseado que no afecta sustancialmente de forma adversa a la estabilidad del compuesto. En una realización, sustituyentes deseados son aquellos que no afectan adversamente a la actividad de un compuesto. Un sustituyente que afecta sustancialmente a la actividad de un compuesto es aquella que provoca que la CI50 del compuesto sea mayor que 100 μ M. En realizaciones preferidas, un compuesto de la invención tiene una CI50 en un ensayo o prueba indicativo de actividad útil para el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con IL-12 (o relacionadas con IL-23 o IL-27). Tales ensayos son conocidos por experto ordinario en la técnica, e incluyen, p. ej., los ensayos descritos en esta memoria, p. ej., los ensayos descritos en los Ejemplos 12-14. En realizaciones preferidas, el ensayo es un ensayo del Ejemplo 12 y el compuesto tiene una CI50 menor que 1,0 μ M, más preferiblemente menor que 100 μ M, más preferiblemente menor que 10 μ M, más preferiblemente menor que 1 μ M, más preferiblemente menor que 100 nM, y más preferiblemente menor que 10 nM. El término "sustituido" se refiere a uno o más sustituyentes (que pueden ser iguales o diferentes), que en cada caso reemplazan a un átomo de hidrógeno. Ejemplos de sustituyentes incluyen, pero no se limitan a halógeno (F, Cl, Br o I), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, ciano, nitro, mercapto, oxo (es decir, carbonilo), tio, imino, formilo, carbamido, carbamilo, carboxilo, tioureido, tiocianato, sulfoamido, sulfonilalquilo, sulfonilarilo, alquilo, alquenilo, alcoxi, mercaptoalcoxi, arilo, heteroarilo, ciclilo, heterociclilo, en donde alquilo, alquenilo,

alquiloxi, arilo, heteroarilo, ciclilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos con alquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, hidroxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, oxo (=O), tioxo (=S) o imino (=NRc).

En otras realizaciones, los sustituyentes en cualquier grupo (tal como, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, ciclilo, heterocicloalquilo y heterociclilo) pueden estar en cualquier átomo de ese grupo, en donde cualquier grupo que puede estar sustituido (tal como, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, ciclilo, heterocicloalquilo y heterociclilo) puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes (que pueden ser iguales o diferentes), reemplazando cada uno a un átomo de hidrógeno. Ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclilo, cicloalquilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, haloalquilo, ciano, nitro, alcoxi, ariloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, oxo (es decir, carbonilo), carboxilo, formilo, alquilcarbonilo, alquilcarbonilalquilo, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi, ariloxycarbonilo, heteroariloxi, heteroariloxycarbonilo, tio, mercapto, mercaptoalquilo, arilsulfonilo, amino, aminoalquilo, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo o alcoxycarbonilamino; alquilamino, arilamino, diarilamino, alquilcarbonilo, arilo o arilo arilamino-sustituido; arilalquilamino, aralquilaminocarbonilo, amido, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, dialquilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, imino, carbamido, carbamilo, tioureido, tiocianato, sulfoamido, sulfonilalquilo, sulfonilarilo o mercaptoalcoxi.

Las frases "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica", tal como se utilizan en esta memoria, significan la administración de un compuesto de la o las invenciones, fármaco u otro material, de tal manera que penetra en el sistema del paciente y, por lo tanto, está sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.

Con respecto a la nomenclatura de un centro quiral, los términos configuración "d" y "l" son como se definen por las Recomendaciones de la IUPAC. En cuanto al uso de los términos diastereómero, racemato, epímero y enantiómero se utilizarán en su contexto normal para describir la estereoquímica de los preparados. Isómeros que se producen de forma natural o sintéticos se pueden separar de varias maneras conocidas en la técnica. Métodos para separar una mezcla racémica de dos enantiómeros incluyen la cromatografía utilizando una fase estacionaria quiral (véase, p. ej., "Chiral Liquid Chromatography", W. J. Lough, comp. Chapman and Hall, Nueva York (1989)). Los enantiómeros pueden separarse también mediante técnicas de resolución clásicas. Por ejemplo, la formación de sales diastereoméricas y la cristalización fraccionada se pueden utilizar para separar enantiómeros. Para la separación de enantiómeros de ácidos carboxílicos, las sales diastereoméricas se pueden formar mediante la adición de bases quirales enantioméricamente puras tales como brucina, quinina, efedrina, estricnina, y similares. Alternativamente, se pueden formar ésteres diastereoméricos con alcoholes quirales enantioméricamente puros tal como mentol, seguido de la separación de los ésteres diastereoméricos e hidrólisis para proporcionar el ácido carboxílico libre, enantioméricamente enriquecido. Para la separación de los isómeros ópticos de compuestos amino, la adición de ácidos carboxílicos o sulfónicos quirales tales como ácido canfosulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico o ácido láctico puede resultar en la formación de las sales diastereoméricas.

Tal como se utiliza en esta memoria, "suprimir una respuesta inmune" se refiere a la reducción de la capacidad de una célula o un animal, particularmente un mamífero para montar o mantener una respuesta inmune y regular a la baja la capacidad inmunoestimuladora de una célula, y similares. Por ejemplo, la reducción de la actividad de FLT3 es un ejemplo de la supresión de una respuesta inmune, o la reducción de una transducción de señales dependiente de FLT3. "Suprimir" la señalización a través de FLT3 incluye cualquiera o la totalidad de los siguientes estados: ralentizar, retrasar, así como detener. Suprimir también abarca células DC, NK y B que pasan por una apoptosis.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Una cantidad eficaz puede ser administrada en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un agente terapéutico es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar o retrasar el progreso del estado patológico. También es una cantidad de un agente que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente o en la prolongación de la supervivencia del paciente con un trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

Tal como se utiliza en esta memoria, "tratamiento" o "tratar" un sujeto incluye la aplicación o administración de un agente terapéutico (p. ej. una molécula pequeña, un anticuerpo y un ácido nucleico antisentido) a un sujeto, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a una célula o tejido de sujeto que tiene una enfermedad o trastorno (p. ej. trastorno relacionado con el sistema inmunológico), tiene un síntoma de una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de (o es susceptible a) una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, alterar, remediar, recuperarse de, mejorar, o afectar la enfermedad o trastorno, el síntoma de la enfermedad o trastorno, o el riesgo de (o susceptibilidad a) la enfermedad o trastorno.

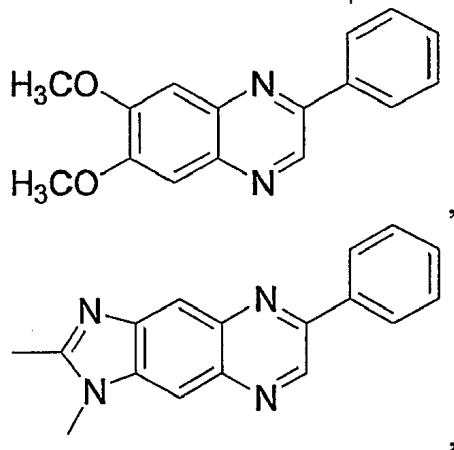
Tal como se estableció anteriormente, inhibidores de FLT3 incluyen moléculas pequeñas, oligonucleótidos anti-sentido,

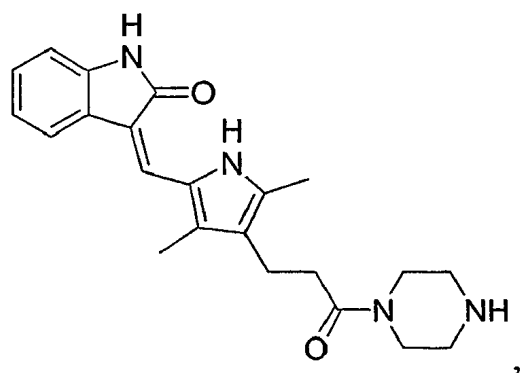
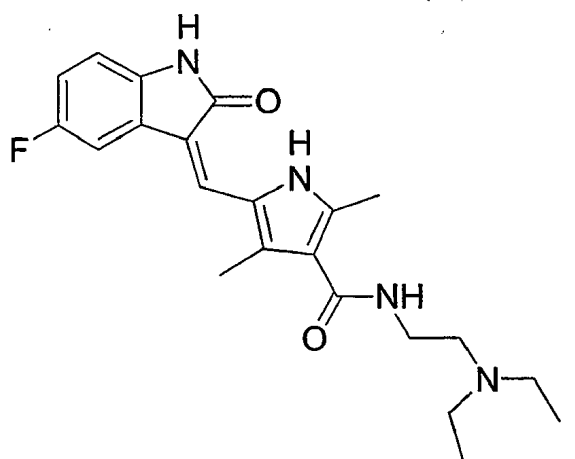
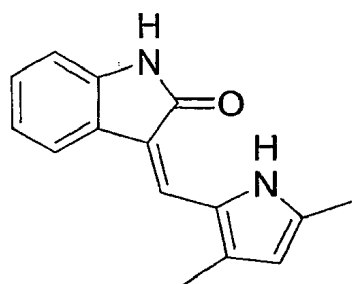
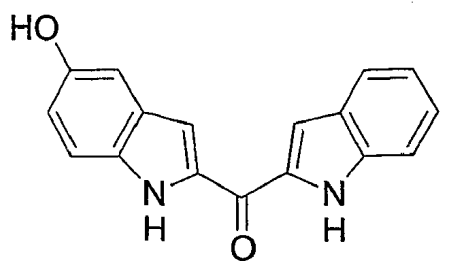
anticuerpos anti-FLT3, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos anti-FLT3, polipéptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos que codifican péptidos, moléculas orgánicas, y cualquier combinación de los mismos.

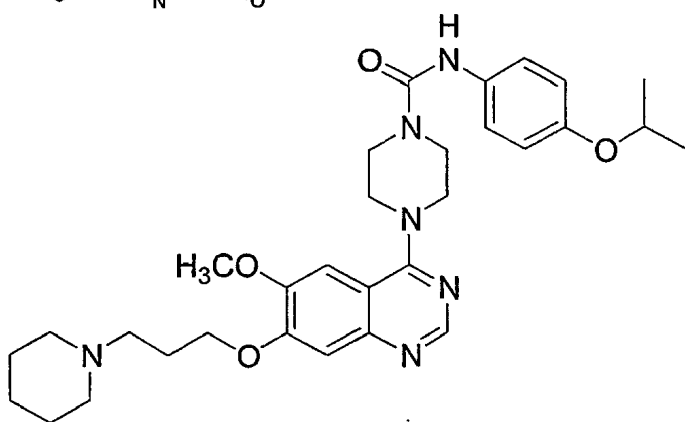
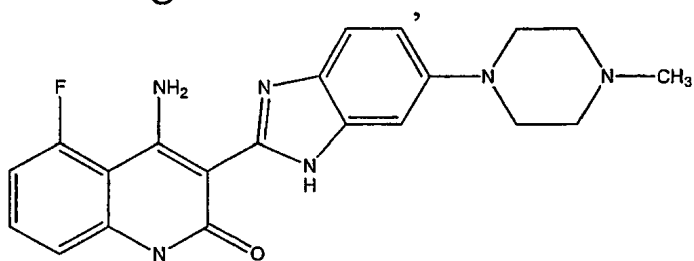
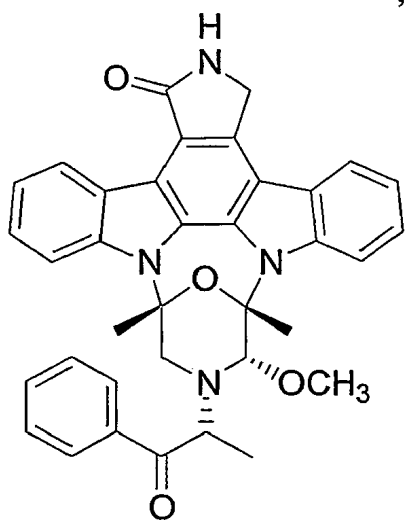
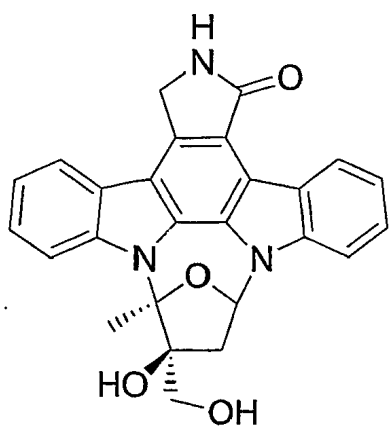
Ejemplos de moléculas pequeñas útiles para la inhibición de FLT3 incluyen CEP701, AG 1296, AG 1295, CEP-5214, CEP-7055, PKC412, SU11248, SU5416, SU5614, MLN518, BAY43-9006, CHIR-258, amino-bencimidazol-quinolonas, Ki23819, derivados de estaurosporina y otras que han sido o serán descubiertas. CEP701, AG 1296, AG 1295 (De Angelo, et al., Phase I clinical results with MLN518, a novel FLT3 antagonist: tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics [abstract] Blood 102, 219a; Estey, et al., (2003) A Randomized Phase II Trial of the Tyrosine Kinase Inhibitor PKC412 in Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML)/High-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) Characterized by Wild-Type (WT) or Mutated FLT3 [abstract] Blood 102, 2270a; Heinrich, et al., (2003) MLN518, a potent FLT3 inhibitor, displays synergistic effects with cytarabine and daunorubicin on FLT3 ITD leukemia cell lines [abstract] Blood 102, 330a; Kelly, L. M., et al. (2002c), CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML) Cancer Cell 1, 421-432; Levis, M., et al., (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo, Blood 99, 3885-3891; Levis, M., and Small, D. (2003b) Novel FLT3 tyrosine kinase inhibitors. Expert Opin Investig Drugs 12, 1951-1962; O'Farrell, et al., (2003a) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo, Blood 101, 3597-3605; Smith, B. D., et al., (2004) Single agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia, Blood, en prensa; Stone, R. M., et al. (2004) PKC 412 FLT3 inhibitor therapy in AML: results of a phase II trial, Ann Hematol 83 Supl. 1, S89-90; Tse, K. F., et al., (2002) Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients by a tyrosine kinase inhibitor, Leukemia 16, 2027-2036; Tse, K. F., et al., (2001) Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor, Leukemia 15, 1001-1010; Weisberg, E., et al., (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412, Cancer Cell, 433-443; y Yee, K. W., et al., (2002) SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase, Blood 100, 2941-2949. Preclinical Studies of CHIR258, a Small Molecule Inhibitor that Targets FGFR3, for the Treatment of t(4;14) Multiple Myeloma, Suzanne Trudel et al.; presentado en la 95ª Junta Anual de la American Association for Cancer Research, marzo 2004, en Orlando, Fla.; Durable In Vivo Target Modulation With CHIR258, a Small Molecule Inhibitor of Growth Factor Tyrosine Kinase Receptors, Is Associated With Potent Antitumor Efficacy Using Various Dosing Schedules, Sang Hoon Lee et al.; presentado en la 95ª Junta Anual de la American Association for Cancer Research, March 2004, en Orlando, Fla.; In Vivo Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity Is Associated With Target Modulation by CHIR258, a Small Molecule Inhibitor of Receptor Tyrosine Kinases, Sang Hoon Lee et al.; presentado como una Charla de Simposio en el Keystone Symposium on Protein Kinases and Cancer: The Promise of Molecular-Based Therapies, febrero 2004, en Silverthorne, Colo; y Preclinical Pharmacology of FLT-3 Kinase Inhibitor CHIR258 in the Treatment of Xenograft Tumors of Human Acute Myelogenous Leukemia, Daniel Menezes et al.; presentado en la Junta Annual de la American Society of Hematology (ASH) diciembre, 2003, en San Diego, Calif. Ki23819 is disclosed in Leukemia (2005) 19, 930-935, 7 de abril de 2005.

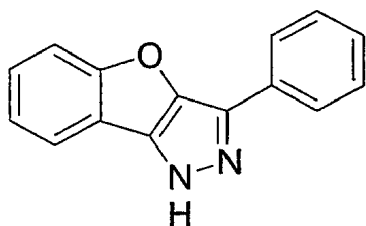
Ejemplos adicionales de compuestos útiles en los presentes métodos incluyen compuestos descritos en las siguientes 18 patentes de EE.UU. o solicitudes de patente de EE.UU. (listadas como números de publicación) 20050143442, 20050143382, 20050137241, 20050020570, 20030219827 y 20040106615.

Ejemplos de inhibidores de FLT3 preferidos para uso de acuerdo con la invención incluyen compuestos de indolinona, compuestos de bis(1H-2-indolil)-1-metanona, compuestos de indolocarbazol y compuestos de quinoxalina, preferiblemente en que dichos compuestos muestran actividad de inhibición de FLT3 tal como se describe en esta memoria. Inhibidores de FLT3 específicamente preferidos para uso de acuerdo con la invención incluyen los siguientes:

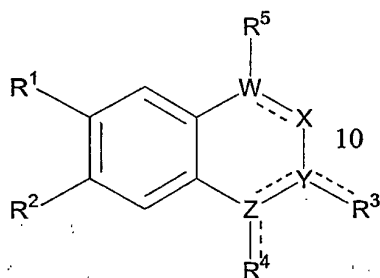








Compuestos inhibidores de FLT3 útiles en la invención pueden incluir también compuestos de acuerdo con la fórmula I:



(fórmula I)

en donde:

W puede ser C, N, O;

X puede ser C, N, ausente;

Y puede ser C;

Z puede ser C, N;

y los grupos R pueden ser variantes sustituidas de:

R1 puede ser H, alcoxi, hidroxilo, alquilo heterocíclico/arilo;

R2 puede ser H, F, alcoxi, alquilo heterocíclico/arilo;

R3 puede ser H, O, arilo, heteroarilo, C(O)heteroarilo;

R4 puede ser H, alquilo, arilo, heteroarilo, CH-heteroarilo, ausente;

R5 puede ser H, arilo, heteroalquilo/arilo, ausente; e

indicando las líneas discontinuas entre WX, WY, YZ, YR3 y ZR4 un doble enlace opcional entre los átomos respectivos.

Los sustituyentes de fórmula I pueden estar opcionalmente sustituidos tal como se describe en esta memoria.

La eficacia de cualquier agente terapéutico particular para los métodos de tratamiento se puede determinar fácilmente. Por ejemplo, compuestos adecuados se pueden identificar a través de los ensayos in vitro, que ensayan la capacidad de inhibir la autofosforilación de FLT3, que incluyen los siguientes pasos, 1) poner en contacto células con un potencial inhibidor de FLT3, y 2) medir el estado de fosforilación de FLT3 en las células con relación a los controles (es decir, las mismas células no tratadas con el compuesto o compuestos candidatos). Un ensayo de autofosforilación de este tipo que incluye los pasos 1) y 2) se define en esta memoria como "ensayo in vitro de FLT3 estándar", y se discute en Tse, K.F., Novelli, E., Civin, C. I., Bohmer, F. D. y Small, D. (2001) Leukemia, 15(7):1001-10, Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine Kinase inhibitor.

Compuestos inhibidores de FLT3 potencialmente útiles también pueden evaluarse tal como se describe en los ejemplos que siguen, que incluye: la administración de un agente inhibidor de FLT3 candidato a un ratón que tiene un nivel elevado de la actividad del receptor FLT3, y la medición de un cambio en la respuesta inmune, en donde una disminución en la respuesta inmune indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico. Los compuestos potencialmente útiles son útiles sin la adición de o la co-administración de un

antagonista de interferón que reduce la actividad de interferón de tipo II. Sin embargo, en determinadas realizaciones, puede ser útil la adición de un antagonista de interferón que reduce la actividad de interferón de tipo I. Tal como se utiliza en esta memoria, un "antagonista de interferón" abarca un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico que codifica un polipéptido, una molécula orgánica o cualquier combinación de los mismos que sea capaz de reducir la actividad o función de un interferón de tipo I en una célula dentro de la un sujeto o una célula *in vitro*.

Agentes terapéuticos preferidos para uso en los métodos terapéuticos de la invención inhiben la actividad de FLT3 por lo menos en un 50% y preferiblemente > 90% según se determina por un ensayo de inhibidor de FLT3 estándar *in vitro*. Más preferiblemente, los agentes inhiben la actividad de FLT3 en al menos aproximadamente un 45% o 65%, y todavía más preferiblemente en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en un ensayo de inhibidor de FLT3 estándar *in vitro*.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluidas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, incluidos fragmentos Fab o fragmentos de reconocimiento del antígeno de los mismos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser de cualquier especie de origen, incluido (ejemplo por) ratón, rata, conejo, caballo, ser humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos. Véase, *p. ej.*, M. Walker et al., *Molec. Immunol* 26: 403-11 (1989); Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 81: 6851 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312: 604 (1984). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE.UU. N° 4.474.893 (Reading) o la patente de EE.UU. N° 4.816.567 (Cabilly et al.). Los anticuerpos también pueden ser contruidos químicamente por parte de anticuerpos específicos hechos de acuerdo con el método descrito en la patente de EE.UU. N° 4.676.980 (Siegel et al.). Los anticuerpos pueden ser monoclonales, quiméricos, anti-idiotípicos, humanizados, primatizados y cualquier combinación de los mismos.

Los anticuerpos de FLT3 incluyen anticuerpos que se unen a FLT3 de manera que inhiban su activación. Esto incluye anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, que se unen a FLT3 e inhiben la capacidad de FL de estimularlos ya sea bloqueando la unión de FL a FLT3 o induciendo cambios conformacionales en FLT3, que bloquean su capacidad de señal. La expresión "no se une" con respecto a dichos anticuerpos significa que no reaccionan sustancialmente en comparación con la unión a FLT3. Ejemplos de anticuerpos de FLT3 incluyen IMC-NC7 and IMC-EB10 (Li, Y., Li, H., Wang, M., Lu, D., Wu, Y., Bassi, R., Zhang, H., Ludwig, D., Pytowski, B., Kussie, P., Piloto, O., Small, D., Bohlen, P., Witte, L., Zhu, Z., e Hicklin, D.J. *Suppression of human leukemia in models that express wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody*. *Blood* (Epub 2004, en prensa, 2004).

Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos que se unen a FLT3 fosforilada o FLT3 no fosforilada. Los anticuerpos pueden ser específicos para cualquiera de FLT3 que esté fosforilada o no fosforilada. Específicamente, según se utiliza en esta memoria en el contexto de anticuerpos se refiere a la capacidad de un anticuerpo de distinguir y de unirse exclusivamente a FLT3.

Anticuerpos que distinguen FLT3 fosforilada o no fosforilada también pueden ser útiles para determinar la eficacia de los inhibidores de FLT3 de la invención o la supresión de las células o la respuesta inmune de los sujetos. Por ejemplo, el nivel de FLT3 fosforilada puede determinarse utilizando dichos anticuerpos, por ejemplo, mediante transferencias Western.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica se pueden utilizar para la producción de anticuerpos contra FLT3 o fragmento, derivado, homólogo o análogo de la proteína. Anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos sintéticos, Fvs de cadena sencilla (scFv) (incluidos los scFvs biespecíficos), fragmentos Fab de anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos F(ab'), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) Fvs unidos por disulfuro (sdFv), y fragmentos de unión a un epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno (*p. ej.* una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo).

Para la producción del anticuerpo, varios animales huéspedes pueden ser inmunizados mediante inyección, *p. ej.*, con una proteína nativa de FLT3 o una versión sintética, o un derivado de los anteriores. Tales animales huéspedes incluyen, pero no se limitan a conejos, ratones, ratas, etc. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, e incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*. Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra FLT3 o un derivado, fragmento, homólogo o análogo de los mismos, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por

Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), la técnica del trioma (Gustafsson *et al.*, 1991, *Hum. Antibodies Hybridomas* 2:26-32), la técnica del hibridoma de células B humano (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, en: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). En una forma de realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales libres de gérmenes utilizando tecnología reciente descrita en la solicitud de patente internacional PCT/US90/02545. Fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos de FLT3 se pueden generar por técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a F(ab')₂ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; el fragmento Fab' que se puede generar reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂; el fragmento Fab que puede generarse tratando el anticuerpo molecular con papaína y un agente reductor; y fragmentos Fv. Anticuerpos sintéticos, *p. ej.*, anticuerpos producidos por síntesis química, son útiles en la presente invención.

Los oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla (ya sea ARN o ADN) capaces de unirse a una secuencia diana de ARNm de FLT3 (formando un dúplex) o a la secuencia de FLT3 en la hélice de ADN de doble cadena (formando una triple hélice) se pueden preparar de acuerdo con la invención. Oligonucleótidos antisentido o sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de ADNc de FLT3. Un fragmento de este tipo comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos. La capacidad de crear un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc para una proteína dada se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48:2659, 1988 y van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958, 1988. Oligonucleótidos anti-sentido incluyen, por ejemplo, Small, D., Levenstein, M., Kim, E.K., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajezak, M., Gewirtz, A. M. y Civin, C.I. STK-1, el homólogo humano de Flk-2/FLT3 se expresa selectivamente en células de la médula ósea humana CD34+ y está implicado en la proliferación de células progenitoras tempranas/madre. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 459-463, 1994. La secuencia se muestra en la Figura 9. Secuencias útiles incluyen las secuencias completas mostradas en la figura 9 o fragmentos biológicamente activos de las mismas. Un experto en la técnica sería capaz de identificar fácilmente fragmentos útiles de los mismos por medios rutinarios.

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias diana de ácidos nucleicos resulta en la formación de complejos que bloquean la traducción (ARN) o la transcripción (ADN) por uno de varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido se pueden utilizar, por lo tanto, para bloquear la expresión de proteínas de FLT3. Oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden, además, oligonucleótidos que tienen cadenas principales de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces azúcar, tales como los descritos en el documento WO91/06629) y en donde dichos enlaces azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces azúcar resistentes son estables in vivo (es decir, son capaces de resistir la degradación enzimática), pero conservan la especificidad de la secuencia para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana. Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos tales como los descritos en el documento WO90/10448, y otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana tales como poli-(l-lisina). Más aún, los agentes intercalantes tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia de nucleótidos diana.

Oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier método de transferencia génica, que incluye, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO₄, electroporación, o mediante el uso de vectores de transferencia génica tales como el virus Epstein-Barr. Oligonucleótidos antisentido o sentido se introducen preferiblemente en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por inserción del oligonucleótido antisentido o sentido en un vector retroviral adecuado, poniendo luego en contacto la célula con el vector retrovirus que contiene la secuencia insertada, ya sea in vivo o ex vivo. Vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan al retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase la solicitud PCT de EE.UU. N° 90/02656).

Oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando tal como se describe en el documento WO 91/04753. Moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero no se limitan a receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o para bloquear la entrada del oligonucleótido antisentido o sentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, un oligonucleótido sentido o un oligonucleótido antisentido se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido tal como

se describe en el documento WO 90/10448. El complejo oligonucleótido-lípido sentido o antisentido es disociado preferiblemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

Lo que sigue son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, AFNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de enlace tales como fluororribosa y tioato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de los nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización tal como mediante conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los remates, la sustitución de uno o más de los nucleótidos que se presentan de forma natural con un análogo, y la introducción de medios para fijar el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o un soporte sólido. Preferiblemente, el polinucleótido es ADN. Tal como se utiliza en esta memoria, "ADN" incluye no sólo las bases A, T, C y G, sino también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleótidos tales como enlaces no cargados y tioatos, el uso de análogos de azúcar y estructuras de la cadena principal modificadas y/o alternativas tales como poliamidas. Un polinucleótido o una región de polinucleótido tiene un determinado porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95%) de "identidad de la secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases es el mismo al comparar la dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de la secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., comps., 1987) suplemento 30, sección 7.7.18. Un programa de alineamiento preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania), preferiblemente utilizando los parámetros por defecto, que son los siguientes: desajuste = 2; brecha abierta = 0; extender brecha = 2.

En una realización de la invención, el antagonista de interferón reduce la unión de un interferón de tipo I con su receptor. En otra realización, el antagonista de interferón interfiere con la transducción de señales tras la unión del interferón al receptor en células en el sujeto. En otra realización, el antagonista de interferón reduce la producción de interferón por parte de células en el sujeto. En otra realización, el antagonista de interferón reduce la secreción de interferón por parte de células en el sujeto. Aún en otra realización, el antagonista de interferón reduce la biodisponibilidad de interferón en el sujeto. En una realización adicional, el antagonista de interferón es TNF.

Tal como se utiliza en esta memoria, un "interferón de tipo I" incluye IFN-alfa, IFN-beta, IFN-varpi e IFN-tau Oritani et al. ((2001) Cytokines Growth Factor Rev. 12(4):337-48) proporcionan una descripción de otros ejemplos de un interferón de tipo I.

Antagonistas de interferón interfieren con la interacción entre un interferón de tipo I (tal como IFN-alfa) y su receptor, lo que resulta en una reducción en la generación de células presentadoras de antígeno mediante la reducción de la diferenciación de monocitos en DCs que se convierten en células presentadoras de antígeno. La reducción en la generación de células presentadoras de antígeno se puede lograr mediante uno o más mecanismos diferentes, pero el mecanismo exacto por el cual esto ocurre no es crucial para la invención. Por ejemplo, TNF y/o anticuerpos anti-receptor de TNF agonísticos pueden reducir la secreción de interferón de tipo I mediante la aceleración de la diferenciación de pDCs en células no productoras de IFN de tipo I.

Hay numerosos ensayos que se pueden realizar para identificar si un compuesto es un antagonista de interferón útil en la presente invención. Estos ensayos son conocidos por los expertos en la técnica. Un ensayo es un ensayo de diferenciación de células dendríticas en donde se añade un compuesto a ensayar a un cultivo de monocitos bajo condiciones adecuadas para la diferenciación de monocitos en DCs. Las condiciones incluyen la adición de suero SLE o interferón de manera que los monocitos son inducidos a diferenciarse en DCs. Por lo tanto, si el compuesto provoca una inhibición de interferón y/o el suero SLE impulsa la diferenciación de monocitos en DCs, en comparación con la diferenciación de monocitos en cultivos que no tienen el compuesto añadido, entonces el compuesto es un antagonista de interferón.

Otro ensayo para identificar compuestos que son antagonistas de interferón es un ensayo de unión en el que se mide la inhibición de la unión de interferón marcado a un receptor en una célula. Si un compuesto es capaz de inhibir la unión de interferón a su receptor o a las células, que tienen receptores de interferón, el compuesto es un antagonista de interferón.

Además, un ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de interferón es un ensayo para medir la inhibición de interferón producido por las células en respuesta a los desencadenantes que normalmente inducen la producción y/o secreción de interferón, por ejemplo virus. Por lo tanto, si en presencia del compuesto y el desencadenante (p. ej. un virus), una célula que normalmente produce interferón no produce interferón, o produce interferón a un nivel reducido, entonces el compuesto es un inhibidor de interferón.

En una opción, un ensayo para identificar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de interferón es para determinar la cantidad de antagonista de interferón necesaria para reducir la unión del receptor de interferón in vitro al suero tomado de un sujeto a ser tratado. En este ejemplo, la concentración necesaria para reducir la unión en un 50% in vitro será terapéuticamente eficaz in vivo.

5 En una forma de realización de la invención, el antagonista de interferón comprende un anticuerpo anti-IFN-alfa o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En otra realización de la invención, el antagonista de interferón es TNF. En una realización de la invención, el anticuerpo que puede ser un elemento de la composición comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo primatizado y cualquier combinación de los mismos.

10 Los métodos de la presente invención proporcionan suprimir, retrasar el desarrollo de una respuesta inmune, tratar una respuesta inmune incrementada, o reducir una respuesta inmune de una célula.

15 Métodos terapéuticos incluyen seleccionar o identificar células de mamífero o un sujeto mamífero que padece un trastorno inmunológico relacionado, en particular como resultado del trasplante de órganos o de otro trastorno relacionado inmune. Células ilustrativas para el tratamiento incluyen diversas células eucariotas, p. ej. células DC, células B, células T y células NK.

20 La invención también proporciona métodos de tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico en un sujeto. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3 para reducir la actividad de FLT3.

25 Los métodos terapéuticos también proporcionan métodos de tratamiento de un FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 en un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero, en donde el mamífero es un ser humano, un primate, una rata, un perro, un gato o un ratón. Los métodos incluyen la identificación de un sujeto mamífero que padece o puede padecer potencialmente, está en un grupo de alto riesgo de contraer un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, en particular como resultado del rechazo de órganos después de un trasplante, el rechazo del trasplante de médula ósea, rechazo de trasplante de médula ósea no mieloablativo, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad de Graves, anemia hemolítica, granulomatosis de Wegener, hipogammaglobulinemia, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, y lupus. Los métodos de la invención también se pueden utilizar para mejorar el injerto de médula ósea después de regímenes de acondicionamiento no mieloablativos y cualquier combinación de los mismos. Una vez identificados, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3 para reducir la actividad de FLT3. De acuerdo con ciertas formas, el inhibidor de FLT3 reduce la transducción de señales dependiente de FLT3 en el sujeto. Los métodos pueden comprender además, opcionalmente, la co-administración de un inhibidor de células T. Ejemplos de inhibidores de células T adecuados se discuten más adelante.

40 De acuerdo con otras formas, el inhibidor de FLT3 administrado regula a la baja la capacidad inmunoestimuladora de un sujeto. El método para el tratamiento de la enfermedad autoinmune de un paciente puede comprender la etapa de administrar una cantidad de inhibidor de FLT3 suficiente para disminuir el número de células dendríticas del paciente. Se incluyen además métodos para fomentar la supervivencia de injertos y tejidos y órganos trasplantados mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de FLT3.

45 La invención, en particular, proporciona métodos de tratamiento, que comprenden la administración de uno o más compuestos de la invención a un paciente que está siendo sometido a una cirugía de trasplante de órganos, trasplante de pulmón, trasplante de hígado, y similares. Por lo tanto, una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención puede administrarse pre-operación y/o peri-operación y/o post-operación para reducir las respuestas inmunes y el rechazo potencial de órganos.

50 Inhibidores de FLT3 se pueden administrar, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. Los inhibidores de FLT3 se pueden administrar, por ejemplo, en forma de comprimido, en forma de polvo, líquido o en cápsulas. La cantidad de inhibidor de FLT3 administrada diaria puede ser aumentada o disminuida en base al peso, la edad, la salud, sexo o condición médica del sujeto.

55 Métodos de la descripción pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de sujetos mamíferos, por ejemplo seres humanos, para proporcionar terapia y/o profilaxis de la supresión inmune o para proporcionar protección frente a o el tratamiento para un trastorno neurológico. Típicamente, dichos sujetos incluyen los afectados por trastornos relacionados con el sistema inmunológico tales como enfermedad de injerto frente a huésped, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis y lupus.

60 Individuos adecuados para el tratamiento por estos métodos incluyen individuos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, incluidos los individuos en las etapas tempranas o tardías de

trastornos relacionados con el sistema inmunológico, así como individuos que previamente han sido tratados o que están a punto de someterse a un tratamiento, por ejemplo trasplante de órganos. Otros individuos adecuados para los métodos descritos en esta memoria son los que se consideran de alto riesgo para desarrollar un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, tales como aquellos que tienen una predisposición genética para el desarrollo de artritis, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o esclerosis múltiple, y/o que han sido expuestos a un o a varios agentes que se correlacionan con el desarrollo de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico.

La presencia de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico y la idoneidad del individuo para recibir los métodos descritos en esta memoria pueden determinarse por cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, incluidos métodos de diagnóstico tales como las técnicas de imagen, análisis de marcadores séricos, y la biopsia.

En otra forma, los métodos se pueden administrar en combinación con, es decir, co-administrar, otros tratamientos conocidos para trastornos inmunológicos relacionados, que incluyen, pero no limitan a inhibidores de proteasa, agentes anti-inflamatorios, inhibidores de células T, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-piréticos, agentes radio-sensibilizantes, agentes radioprotectores, agentes urológicos, agentes anti-eméticos y/o agentes anti-diarreicos, y similares. Ejemplos incluyen ciclosporina, micofenolato mofetil, azatioprina, metotrexato, tacrolimus, cisplatino, carboplatino, docetaxel, paclitaxel, fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, irinotecán, topotecán, etopósido, mitomicina, gefitinib, vincristina, vinblastina, doxorubicina, ciclofosfamida, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, dexametasona, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, acetaminofeno, misonidazol, amifostina, tamsulosia, fenazopiridina, ondansetrón, granisetron, alosetron, palonosetrón, prometazina, procloroperazina, trimetobenzamida, aprepitant, difenoxilato con atropina. Otros ejemplos de compuestos adecuados para ser co-administrados con los inhibidores de FLT3 de la invención pueden encontrarse en Progress in Drug Research, "Recent advances in immunosuppressants", Bijoy Kundu y Sanjay K. Khare", Vol. 52 (E. Jucker, comp.), 1999, Birkhäuser Verlag, Basilea (Suiza). La administración de tales tratamientos adicionales y/o agentes están destinadas a ser incluidas en los métodos de la presente descripción.

Los compuestos para uso en los métodos pueden administrarse por vía intranasal, oral o por inyección, p. ej. inyección intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o intravenosa, o por medios transdérmicos, intraoculares o enterales. La dosis óptima se puede determinar por medios convencionales. Los compuestos para uso en los métodos se administran adecuadamente a un sujeto en la forma protonada y soluble en agua, p. ej., en forma de una sal farmacéuticamente aceptable de un ácido orgánico o inorgánico, p. ej., hidrocloruro, sulfato, hemi-sulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, citrato, maleato, mesilato, etc.

Compuestos para uso en los métodos se pueden emplear, ya sea solos o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos tal como se discute anteriormente, en forma de una composición farmacéutica en mezcla con excipiente convencional, es decir sustancias de soporte orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables, adecuadas para la administración parenteral, enteral o intranasal que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos y no son perjudiciales para el receptor de los mismos. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, disoluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso petroetral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, etc. Los preparados farmacéuticos se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromas y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos.

Para la aplicación por vía parenteral, son particularmente adecuadas disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluidos supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Para la aplicación por vía enteral son particularmente adecuados comprimidos, grageas o cápsulas que tienen talco y/o ligante soporte de carbohidratos o similares, siendo preferiblemente el soporte lactosa y/o almidón de maíz y/o fécula de patata. Se puede utilizar un jarabe, elixir o similar, en donde se emplea un vehículo edulcorado. Pueden formularse composiciones de liberación sostenida incluidas aquellas en las que el componente activo está protegido con revestimientos diferencialmente degradables, por ejemplo por microencapsulación, recubrimientos múltiples, etc. Para las aplicaciones tópicas, las formulaciones pueden prepararse en una pomada o crema tópica que contiene uno o más compuestos de la invención. Cuando se formula como una pomada, pueden emplearse de manera adecuada uno o más compuestos de la invención con una base parafínica o una base miscible en agua. El uno o más compuestos también pueden formularse con una base de crema de aceite-en-agua. Otras formulaciones tópicas adecuadas incluyen, p. ej. pastillas y parches dérmicos. La administración intravenosa o parenteral, p. ej. subcutánea, intraperitoneal o intramuscular es generalmente preferida.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de los compuestos activos utilizados en una terapia dada variarán de acuerdo con el compuesto específico que esté siendo utilizado, de las composiciones particulares formuladas, del modo de aplicación, del sitio particular de administración, etc. Tasas de administración óptimas para un protocolo de administración dado se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica usando ensayos de determinación

de dosificación convencionales, realizados con respecto a las directrices anteriores. La dosis deseada se administra adecuadamente una vez al día, o varias subdosis, p. ej. 2 a 4 sub-dosis, se administran a intervalos apropiados a lo largo del día, u otro programa apropiado.

También se proporciona un animal no humano transgénico que tiene un receptor de FLT3 constitutivamente activado. Particularmente se proporciona un ratón transgénico conocido como el "ratón transgénico Tel-FLT3" que tiene un gen FLT3 constitutivamente activo insertado en su genoma. El ratón transgénico Tel-FLT3 se produjo de acuerdo con la tecnología transgénica estándar conocida en la técnica. Los ratones transgénicos FLT3 tienen números considerablemente incrementados de DCs en sus bazo y ganglios linfáticos.

Se proporcionan métodos para el uso de animales transgénicos para ensayar agentes terapéuticos. Por ejemplo, etapas del método incluyen, proporcionar a un animal transgénico, preferiblemente un ratón, un gen FLT3 constitutivamente o de manera controlable activo. Los métodos también pueden incluir administrar al animal un agente terapéutico y medir la respuesta inmune del animal para determinar el efecto del agente terapéutico. Por ejemplo, se puede medir el número de DCs, en donde una disminución en el número de DCs indica una disminución en la respuesta inmune del animal. El número de células T también se puede medir después de la administración, en donde una disminución en el número de células T indica una disminución en la respuesta inmune del animal. El estado de fosforilación de FLT3 también se puede utilizar como una indicación de que se suprime la respuesta inmune de la célula o el sujeto después de la administración de los inhibidores de FLT3 de la invención. Por ejemplo, la cantidad de FLT3 fosforilada puede disminuir en la célula o sujeto a quien se ha administrado un inhibidor de FLT3 de acuerdo con los métodos. Los animales transgénicos de acuerdo con determinadas realizaciones son modelos útiles para los trastornos relacionados con el sistema inmunológico. Por ejemplo, seres humanos que padecen determinados trastornos relacionados con el sistema inmunológico tienen un número incrementado de DCs, células T y/o células NK.

La invención también proporciona métodos para rastrear un agente terapéutico para la actividad in vitro e in vivo. Por ejemplo, un agente terapéutico se puede administrar a una célula, que se examina a continuación en cuanto a una disminución de su respuesta inmune. Específicamente, las células de la médula ósea, y más específicamente, las DCs producidas a partir de la médula ósea de un animal son particularmente útiles. Otro tipo y/o líneas de células útiles incluyen linfocitos mixtos, células T y células NK. Para aplicaciones in vitro tales como el método de rastreo de agentes terapéuticos, se puede emplear adecuadamente una placa de múltiples pocillos u otro sustrato de reacción.

Métodos para el rastreo de un agente terapéutico para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico incluyen administrar el agente a un ratón que tiene un nivel elevado de actividad del receptor de FLT3, y medir un cambio en la respuesta inmune, en donde una disminución en la respuesta inmune indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. El cambio en la respuesta inmune es particularmente un número reducido de células DC, células NK y/o células B. El cambio en la respuesta inmune también se puede medir determinando el nivel de proteína coestimuladora de DC, en donde una disminución en el nivel de proteína coestimuladora de DC indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario. De acuerdo con determinadas formas, la proteína coestimuladora de DC medida es B7-DC. De acuerdo con ciertas formas, una medida de la respuesta inmune puede ser una medida del número de células comparado con otras dosis del mismo agente terapéutico o con un control. Las células medidas pueden ser, por ejemplo, células DC, células NK, células del bazo, células de la médula ósea mixta, células T y mezclas de los mismos.

De acuerdo con determinadas formas, el cambio en la respuesta inmune puede ser medido por un ensayo de proliferación de células T, en donde una disminución en la proliferación de células T indica que el agente puede ser útil en el tratamiento de trastornos inmunes relacionados.

La invención proporciona también métodos para el rastreo de un agente terapéutico para la actividad in vivo. Por ejemplo, un agente terapéutico se puede administrar a un mamífero, que luego es examinado en cuanto a una disminución en la respuesta inmune. Específicamente, se ha generado un ratón transgénico en el que el receptor de FLT3 está activado constitutivamente. Los ratones tienen números considerablemente incrementados de DCs en sus bazo y ganglios linfáticos. Se generaron ratones inactivados en los que se ha inactivado el gen FLT3. (K. Mackarehtschian, J.D. Hardin, K.A. Moore, et al., Immunity 3, 147-61 (1995)). Se observó una disminución en los números de células progenitoras de linfocitos B, pero los linfocitos B periféricos no se vieron afectados. Las DCs no se han examinado en estos ratones.

Aunque los métodos de supresión de la respuesta inmune se ejemplifican en la discusión que sigue, se entiende que los métodos alternativos descritos anteriormente son igualmente aplicables y adecuados, y que los puntos finales de estos métodos (por ejemplo, eficacia del tratamiento) se miden utilizando métodos estándares en la técnica, incluyendo métodos de diagnóstico y de evaluación bien conocidos.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLO 1:

El tratamiento de DCs maduras con inhibidores de FLT3 induce la apoptosis en DCs maduras.

La supervivencia y la función de las DC se investigó cuando se exponían a inhibidores de FLT3. DCs maduras se incubaron en un análisis de dosis-respuesta a CEP701, 5214 y AG 1296 en presencia de GM-CSF +/- FL. Se observó una disminución en la supervivencia y la estimulación de las DCs.

La médula ósea (BM) se lavo abundantemente de las extremidades de ratones con PBS, los glóbulos rojos (RBCs) se lisaron en tampón hipotónico, y después de lavar las células se extendieron en placas a razón de 2×10^6 células/ml en GM-CSF (1000 U/ml) o GM + FL (100 ng/ml) que contiene medio. Los días 2, 4 y 6 se separaron células no adherentes y las células adherentes se lavaron antes de la adición de medio de nueva aportación. El día 8, se recolectaron DCs maduras no adherentes, y se volvieron a extender en placas en ausencia o presencia de CEP-701 a 5 ó 50 nM. Después de 24 horas, las células se tiñeron para el análisis FACS. Células CD11c + fueron evaluadas para la expresión de MHC de clase II y la unión de Anexina V (Figura 1A). CEP701 inducía la apoptosis en DCs generadas en GM-CSF sola o en la combinación de GM-CSF y FL. Estos resultados han sido confirmados también utilizando otros dos inhibidores de FLT3, incluyendo CEP-5214 (datos no mostrados) y AG1296.

La Figura 1B muestra los resultados de la estimulación de DCs, generadas lavando abundantemente BM de las extremidades de ratones con PBS, lisando los RBCs y lavando las células. Después del lavado, las células se extendieron en placas a razón de 2×10^6 células/ml en GM-CSF (1000 U/ml) + FL (100 ng/ml) que contiene medio. Los días 2, 4 y 6 se separaron células no adherentes y las células adherentes se lavaron antes de la adición de medio de nueva aportación. El día 8, se recolectaron DCs maduras no adherentes, y se volvieron a extender en placas en ausencia o presencia de AG1296. Después de 24 horas, las células se tiñeron para el análisis FACS. Células dendríticas (células CD11c +) fueron evaluadas para la expresión de CD86 y la unión de Anexina V (Figura 1B). AG1296 inducía la muerte de las células de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, la inhibición de FLT3 puede inducir la muerte de las células en DCs de una manera dependiente de la dosis. Dado que las DCs son las responsables de la presentación de antígeno a células T y de activar a éstas, matando a las DCs, es probable que la supresión de la señalización de DC a través de FLT3, o la prevención de la generación de células DC mediante la inhibición de FLT3 tenga efectos sobre la supresión del brazo de células T del sistema inmunológico. Para que las DCs activen células T, presentan antígeno unido a moléculas de MHC y expresan proteínas co-estimuladoras en sus superficies.

Para investigar el papel de la estimulación de FL/FLT3 en la regulación de la expresión de proteína coestimuladora por parte de DC, hueso humano más IL-4 o GM-CSF más FL se analizaron mediante transferencia Northern en cuanto a la expresión de B7-DC, un miembro de la familia B7 de moléculas co-estimuladoras. La Figura 1C muestra que la adición de FL supra- regula la expresión de B7-DC (GM-CSF sola no mostró expresión; datos no mostrados). Cultivos de BM murino mostraron los mismos resultados mediante FACS. La inhibición de la señalización de FLT3 condujo a una regulación a la baja de B7-DC así como B7.2 (CD 86) en estas DCs (Figura 6). Esto indica que una disminución en las respuestas inmunes puede lograrse no sólo mediante la inducción de la muerte celular de DCs, sino también regulando a la baja su capacidad inmunoestimuladora, mejorando con ello su utilidad como inmunosupresores.

EJEMPLO 2:

La inhibición de FLT3 disminuye la proliferación basada en DC de las células T. Para estos experimentos, las DCs se generaron como antes a partir de ratones BALBc. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con CEP701 y luego se extendieron en placas con esplenocitos C57BL/6 en las relaciones que se muestran. Después de 3 días, se añadió ^3H , y se determinó la proliferación. Como muestra la Figura 2A, CEP701 tenía un potente efecto sobre la disminución de la proliferación. En la Figura 2B, los esplenocitos BALB/c fueron sustituidos por las DCs, con el fin de ensayar la inhibición de CEP701 en una reacción mixta de linfocitos estándar (MLR). Como muestra también esta figura, esta respuesta fue también inhibida en presencia de CEP701.

Para determinar si la respuesta estimulante de células T sería inhibida como resultado de la exposición a AG1296, se llevaron a cabo dos ensayos de proliferación de células T diferentes. La Figura 2C muestra los resultados de co-incubar células del bazo de ratones alogénicos en presencia ($10 \mu\text{m}$) o ausencia de inhibidor. En esta reacción mixta de linfocitos estándar, números iguales de células estimuladoras y respondedoras (10^6 de cada una) se mezclaron en una placa de 96 pocillos, se incubaron durante 4 días, se pulsaron con ^3H -timidina, y la proliferación se determinó analizando la incorporación de tritio. La proliferación estimulada por DC también se determinó incubando DCs derivadas de BM (día 8, como anteriormente) en una relación de 1:10 con esplenocitos alogénicos respondedores, en presencia ($10 \mu\text{m}$) o ausencia de AG1296. Como se muestra en la figura 7 hubo una disminución en la proliferación de células T inducida por DCs en presencia de AG1296.

EJEMPLO 3:

El tratamiento de células T no inhibe directamente su proliferación.

Para demostrar que la inhibición observada en las figuras 2a y b se debía a un efecto del inhibidor en las DCs y no a las

células T en sí, 1×10^6 células T se extendieron en placas recubiertas con anti-CD3. Las células T se estimularon después con anticuerpo anti-CD28. Después de 2 días, se añadió ^3H y se determinó la proliferación. Tal como muestra la figura, no se observó efecto alguno sobre la estimulación directa de células T.

5 EJEMPLO 4:

El tratamiento de ratones con inhibidores de FLT3 disminuye poblaciones cd11c pero no CD3 o B220.

10 Ratones BALB/c fueron tratados con 20 mg/kg de CEP701 o vehículo dos veces al día durante 5 días, y luego se analizaron en cuanto a sus poblaciones inmunes. Los bazo y los ganglios linfáticos se recogieron y se digirieron con colagenasa para liberar DCs del estroma. Las células se lavaron y analizaron luego mediante FACS en cuianto a la presencia de T (CD3 +/DX5-), NK (CD3-, DX5+), B (B220+, CD11c-) o DCs (CD11c+). Tal como muestran las Figuras 4 a y b, mientras que este tratamiento condujo a una disminución en las poblaciones de NK y DC, no se observó cambio significativo alguno en las poblaciones de células B o T.

15 EJEMPLO 5:

El tratamiento de ratones con inhibidores de FLT3 disminuye una respuesta inmune in vivo, y la inhibición de DCs era suficiente para regular a la baja una respuesta inmune.

20 Para determinar si la inhibición de FLT3 conduciría a una regulación a la baja in vivo de una respuesta inmune, a los ratones que son transgénicos para el antígeno de hemaglutinina de influenza (HA) (los ratones se denominan "137") se les inyectaron células T transgénicas que son específicas para HA (estas células T CD4+ se denominan "6.5" y expresan el marcador de células T congénico thy1.1. En este sistema de modelo, las células T transgénicas transferidas se expanden e inducen un proceso autoinmune. (Huang CT JI 2003). Para estos experimentos, 137 ratones fueron tratados con CEP701 como anteriormente, durante 3 días antes de la transferencia, y 5 días después de la transferencia. Después de 5 días, se analizó en los ratones la expansión de las células T. Tal como muestra la Figura 5, el tratamiento con CEP701 condujo a una disminución en la expansión de células T autorreactivas, tal como se mide por thy 1.1.

30 EJEMPLO 6:

Anticuerpos Monoclonales contra FLT3

Este ejemplo ilustra un método para preparar anticuerpos monoclonales contra FLT3. FLT3 se expresa en células huésped de mamífero tales como células COS-7 o CV-1/EBNA-1 y se purifica utilizando la cromatografía de afinidad de FLT3:Fc. FLT3 purificada o un fragmento de la misma tal como el dominio extracelular, péptidos sintéticos o células que expresan FLT3 se pueden utilizar para generar anticuerpos monoclonales contra FLT3 utilizando técnicas convencionales, por ejemplo las técnicas descritas en la patente de EE.UU. N° 4.411.993. En síntesis, se inmunizan ratones con FLT3 como un inmunógeno emulsionado en un adyuvante, por ejemplo adyuvante completo de Freund, y se inyecta en cantidades que oscilan entre 10-100 µg por vía subcutánea o intraperitoneal. Diez a doce días más tarde, los animales inmunizados se refuerzan con FLT3 adicional emulsionada en un adyuvante. Los ratones se refuerzan después periódicamente con un programa de inmunización semanal a quincenal. Las muestras de suero se toman periódicamente por sangrado retro-orbital o escisión en la punta de la cola para ensayar los anticuerpos de FLT3 mediante ensayo de bórñon por puntos dot o ELISA (análisis con enzima unida a inmunosorbente).

45 Después de la detección de un título de anticuerpos apropiado, a los animales positivos se les proporciona una última inyección intravenosa de FLT3 en solución salina. De tres un cuatro días más tarde, se sacrifican los animales, se recogen células del bazo y las células del bazo se fusionan a una línea celular de mieloma murino, p. ej. NS1 o preferiblemente P3 X 63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se extienden en múltiples placas de microtitulación en un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) selectivo para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

50 Las células de hibridoma se rastrean mediante ELISA en cuanto a la reactividad contra FLT3 purificada mediante adaptaciones de las técnicas descritas en Engvall et al., Immunochem. 8:871, 1971 y en la patente de EE.UU. N° 4.703.004. Una técnica de rastreo preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita en Beckmann et al., (J. Immunol 144:4212, 1990). Células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones singénicos BALB/c para producir ascitis que contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-FLT3. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar in vitro en matraces o frascos rotativos mediante diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden purificarse mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, también se puede utilizar la cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o proteína G, al igual que la cromatografía de afinidad basada en la unión a FLT3.

EJEMPLO 7:

El Tratamiento Con Inhibidores de FLT3 Mejora la Encefalomiелitis Autoinmune Establecida Experimental

A ratones C57BL/6 se les inyectaron 100 microgramos de la encefalomyelitis autoinmune experimental establecida (EAE) que inducen el péptido 35-55 en CFA con 400 microgramos de Mycobacterium tuberculosis. El día de la inmunización y 48 horas más tarde, los ratones fueron reforzados con la toxina pertussis, siguiendo protocolos estándar. Dentro de un día de los síntomas iniciales, a los ratones se les inyectó control vehículo o CEP-701 (20 mg/kg), y se puntuó diariamente por un observador ciego. Las puntuaciones eran las siguientes: 0 (sin síntomas), 0,5 (pérdida parcial de la tonicidad de la cola), 1 (pérdida total de la tonicidad de la cola), 2 (marcha afectada), 2.5 (parálisis parcial de las extremidades traseras), 3 (parálisis completa de las extremidades traseras), 4 (parálisis delantera y trasera), 5 (moribundo). 10 ratones/grupo fueron tratados en el estudio mostrado. La Figura 8 muestra gráficamente que los ratones tratados con CEP-701 (inhibidor de FLT3) tienen puntuaciones más bajas, lo que indica que los inhibidores de FLT3 mejoraban la EAE.

EJEMPLO 8:

En referencia a la Figura 10, cerebro y médulas espinales intactas fueron retirados de ratones que se inmunizaron con péptido MOG, y fueron tratados con el control de vehículo o con CEP-701 después de la aparición de los síntomas. Tras el tratamiento y la puntuación, los ratones se mantuvieron durante 2 meses adicionales, y luego se sacrificaron y el SNC se preparó para la evaluación mediante conservación en formalina. Secciones de plástico delgadas (1 mm) se generaron a partir del nivel cervical 5, seguido de tinción en azul de toluidina y se visualizaron los axones. Los números totales de los axones y fibras que se degeneran activamente en una zona predefinida de la columna dorsal medial fueron enumerados por un examinador experimentado de una manera ciega. Las gráficas muestran el número de fibras axonales degenerantes en la zona del campo definido para las secciones de ratones tratados con CEP-701 en comparación con los ratones de control de vehículo 210 días después de la inducción de la enfermedad. Estos resultados indican que la inhibición de FLT 3 conduce a una disminución en la neurodegeneración.

La invención ha sido descrita en detalle con referencia particular a las realizaciones de la misma. Sin embargo, se apreciará que las modificaciones y mejoras dentro del espíritu y las enseñanzas de las invenciones pueden ser realizadas por expertos en la técnica al considerar la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la quinasa FLT3 para uso en el tratamiento de un trastorno de FLT3 o un trastorno relacionado con FLT3 en un sujeto,

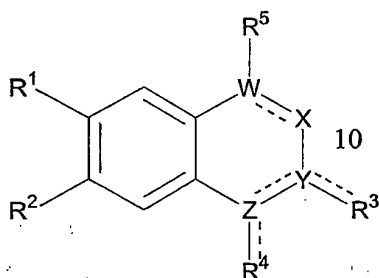
en donde el trastorno de FLT3 o trastorno relacionado con FLT3 se selecciona del grupo que consiste en rechazo de órgano, rechazo de trasplante de médula ósea, rechazo de trasplante de médula ósea no mieloablativo, espondilitis anquilosante, artritis, anemia aplásica, enfermedad de Behcet, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, granulomatosis de Wegener, síndrome de hiper IgE, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, miastenia grave, psoriasis, lupus, trastornos desmielinizantes, mielitis transversa aguda, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o panencefalitis esclerosante subaguda;

y en donde el inhibidor de la quinasa FLT3 se selecciona de uno o más del grupo:

(a) un oligo-nucleótido anti-sentido, un anticuerpo anti-FLT3, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-FLT3, un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico que codifica un péptido,

(b) CEP701, AG 1296, AG 1295, CEP-5214, CEP-7055, PKC412, SU11248, SU5416, SU5614, MLN518, BAY43-9006, CHIR-258, amino-bencimidazol-quinolonas, Ki23819, estaurosporina,

(c) un compuesto de acuerdo con la fórmula 1:



(fórmula 1)

en donde:

W puede ser C, N u O;

X puede ser C, N, ausente;

Y puede ser C;

Z puede ser C, N;

y los grupos R pueden ser variantes sustituidas de:

R¹ puede ser H, alcoxi, hidroxilo, alquilo heterocíclico/arilo;

R² puede ser H, F, alcoxi, alquilo heterocíclico/arilo;

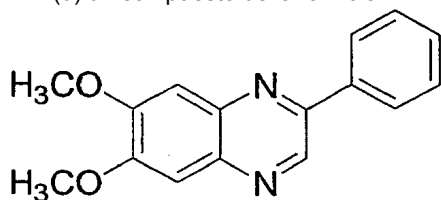
R³ puede ser H, O, arilo, heteroarilo, C(O)heteroarilo;

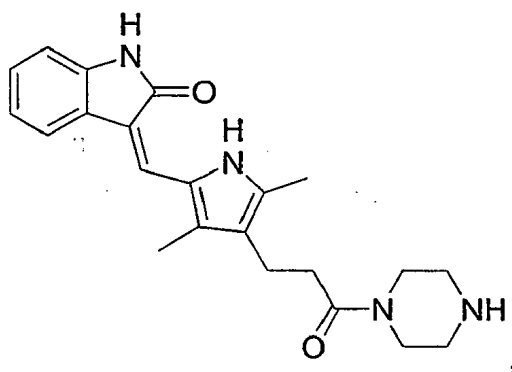
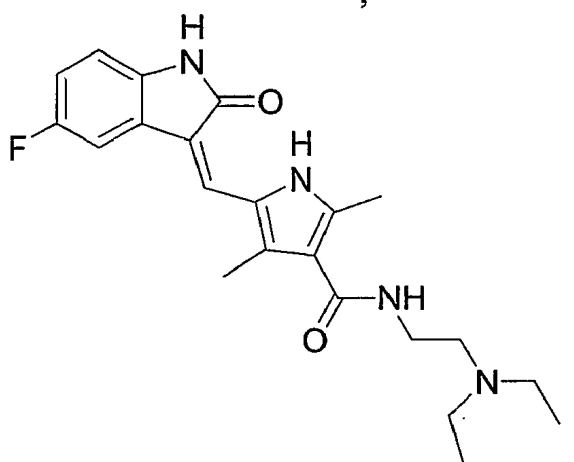
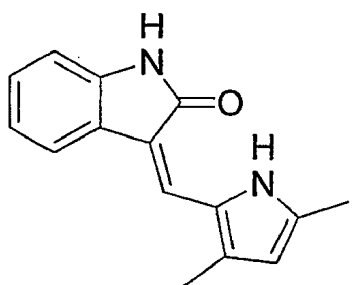
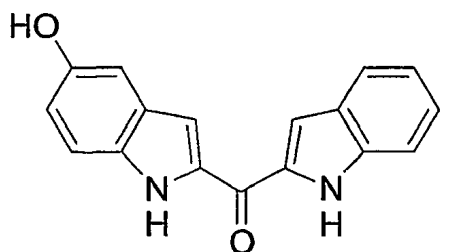
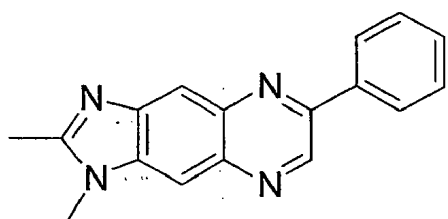
R⁴ puede ser H, alquilo, arilo, heteroarilo, CH-heteroarilo, ausente;

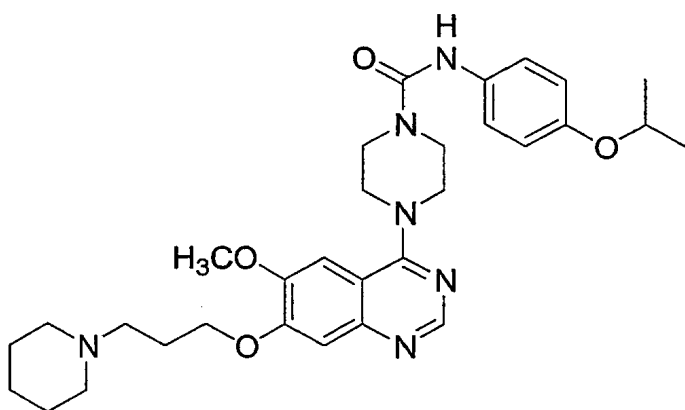
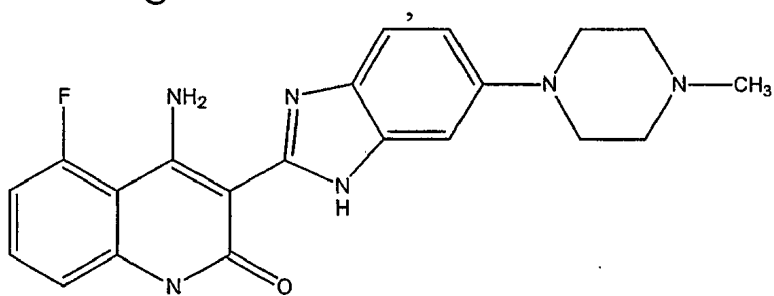
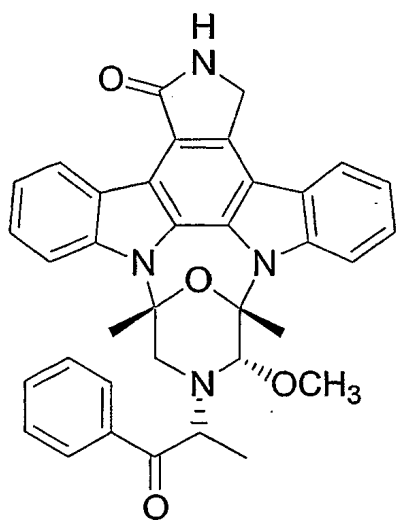
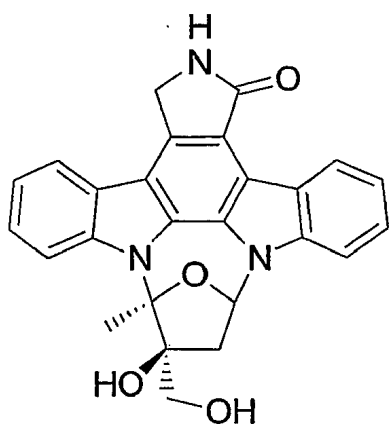
R⁵ puede ser H, arilo, heteroalquilo/arilo, ausente; e

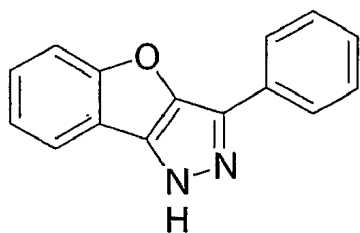
indicando las líneas discontinuas entre WX, WY, YZ, YR3 y ZR4 un doble enlace opcional, en donde el arilo, heteroarilo, alquilo heterocíclico/arilo están opcionalmente sustituidos, y

(d) un compuesto de la fórmula









2. El inhibidor de la quinasa FLT3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-FLT3 comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo primatizado, y cualesquiera combinaciones de los mismos.
3. El inhibidor de la quinasa FLT3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo reconoce específicamente una forma fosforilada de FLT3.
4. El inhibidor de la quinasa FLT3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo reconoce específicamente una forma no fosforilada de FLT3.
5. El inhibidor de la quinasa FLT3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido anti-sentido se selecciona de uno o más de la secuencia de nucleótidos de la Figura 9 o un fragmento biológicamente activo del mismo.

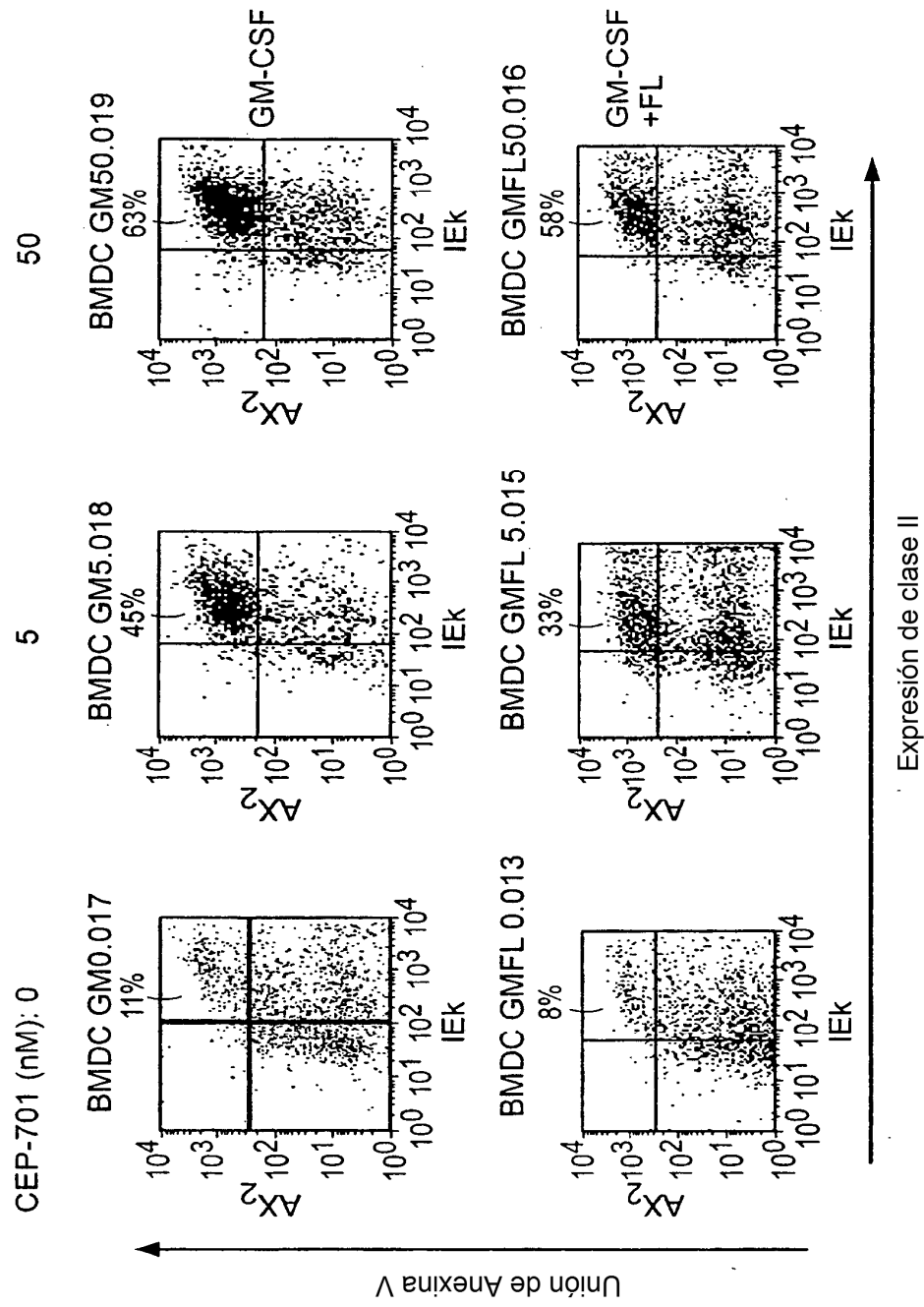


FIG. 1A

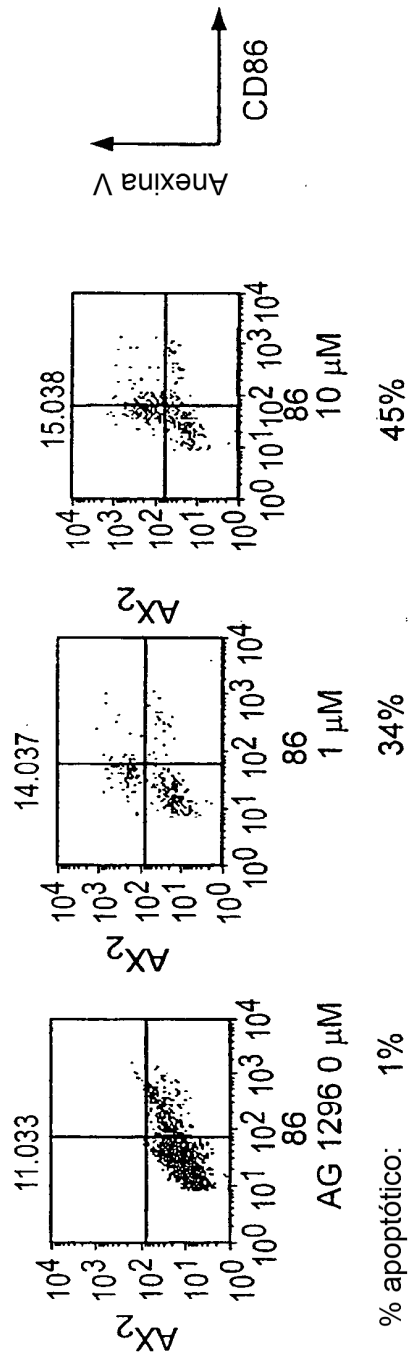


FIG. 1B

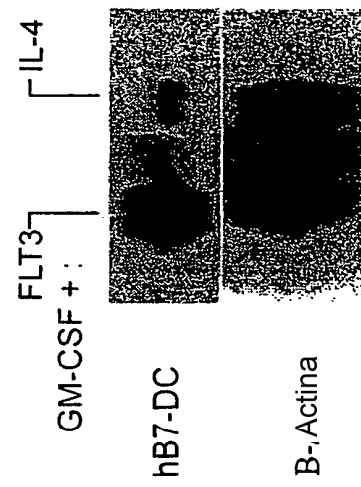


FIG. 1C

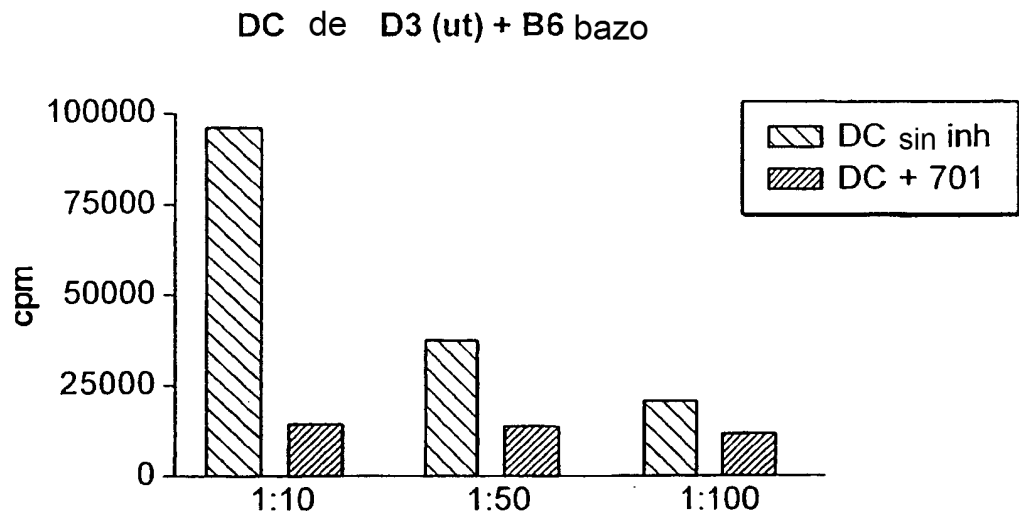


FIG. 2A

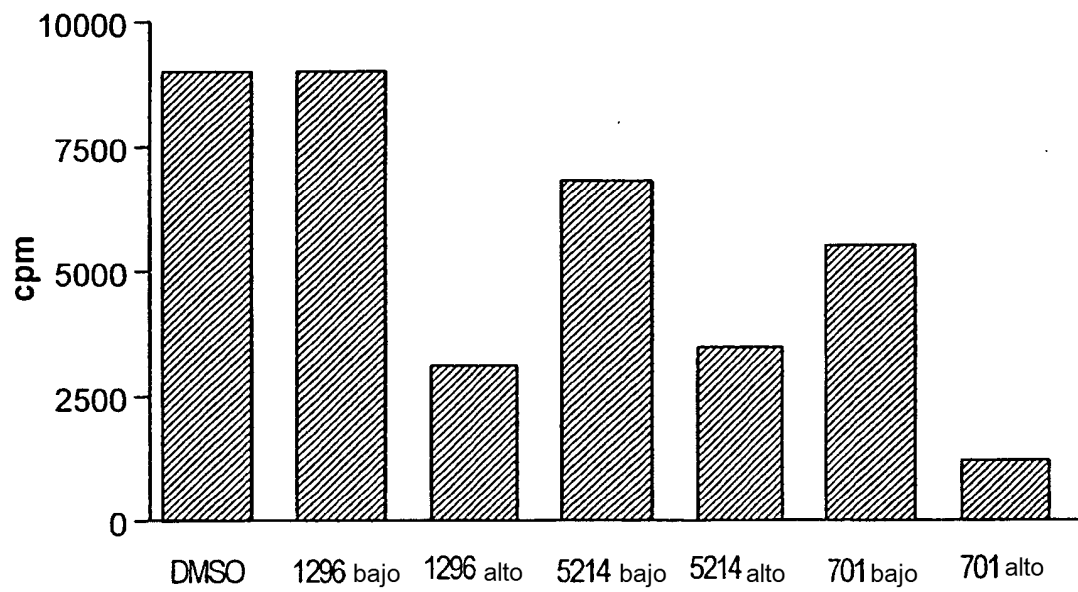


FIG. 2B

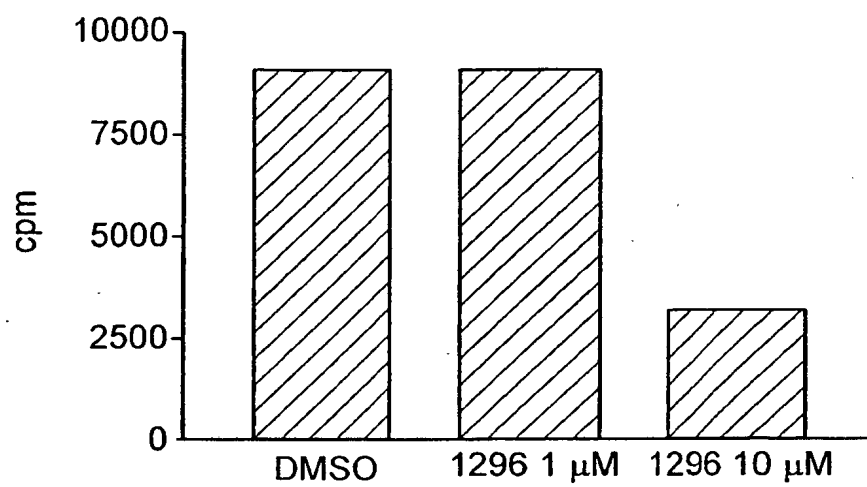


FIG. 2C

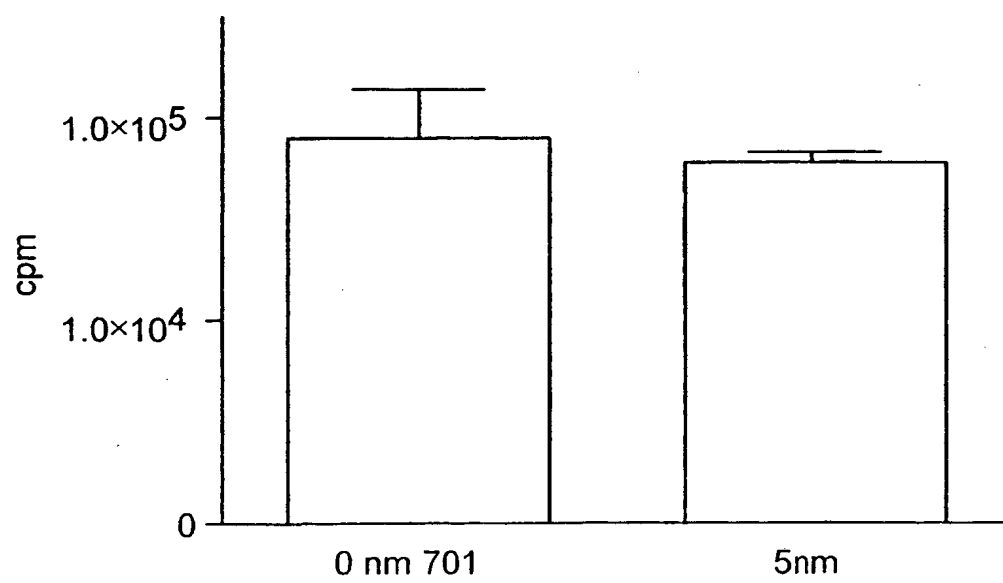


FIG. 3

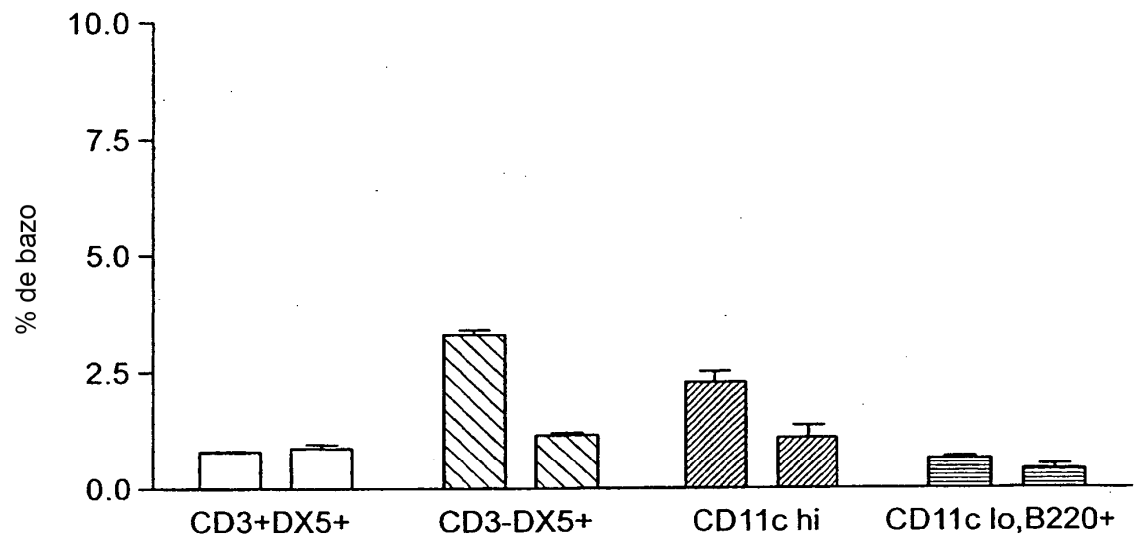


FIG. 4A

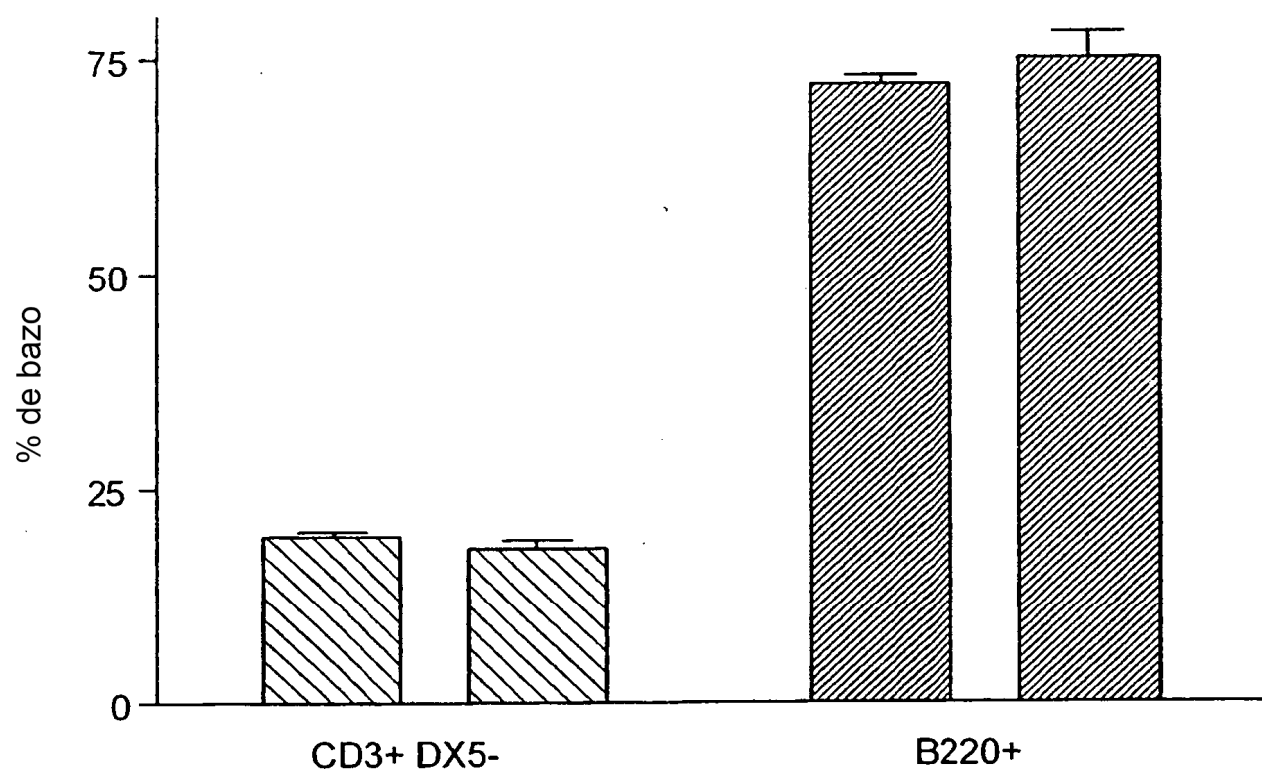


FIG. 4B

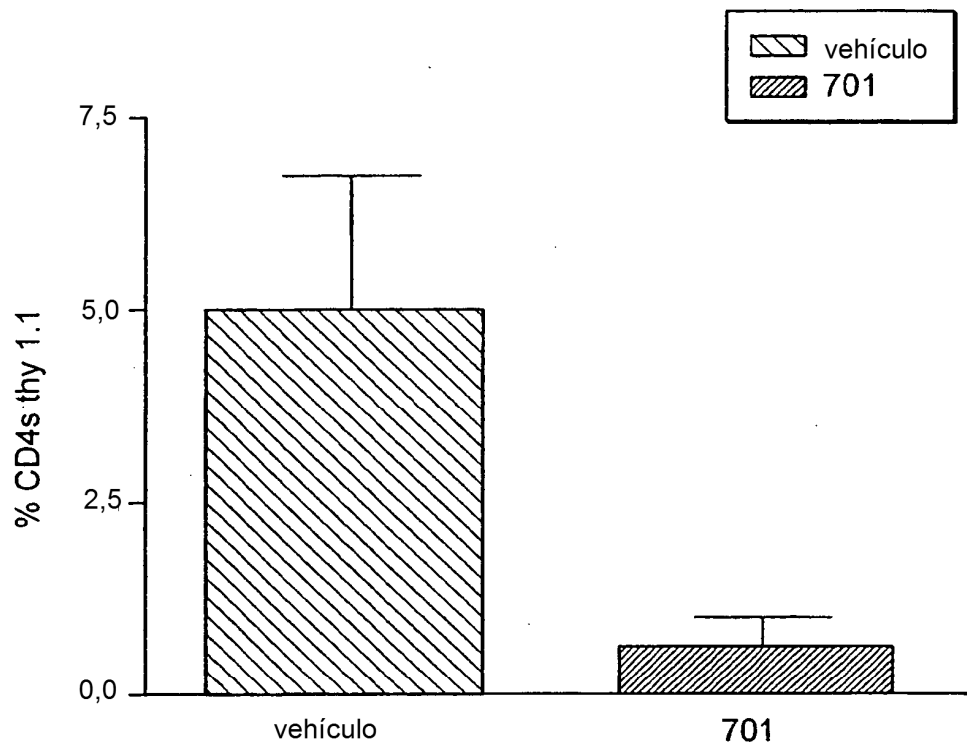
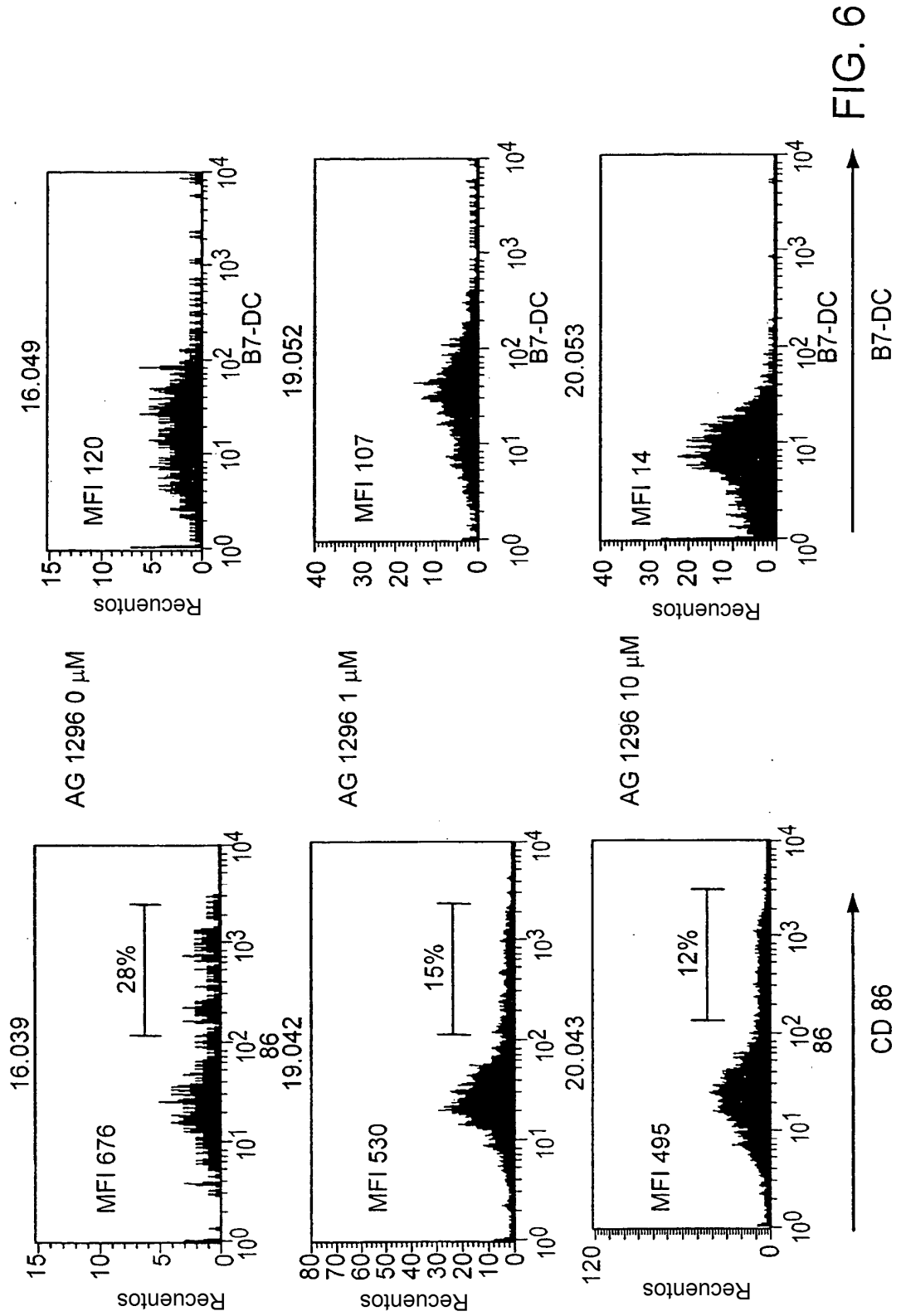


FIG. 5



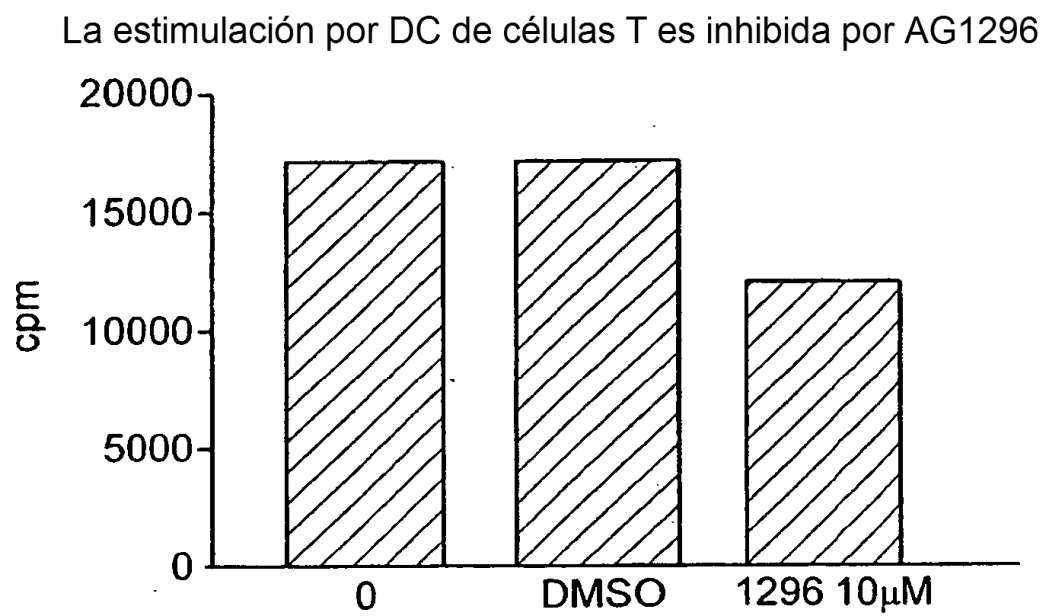


FIG. 7

El tratamiento con FLT3 I invierte los síntomas de EAE

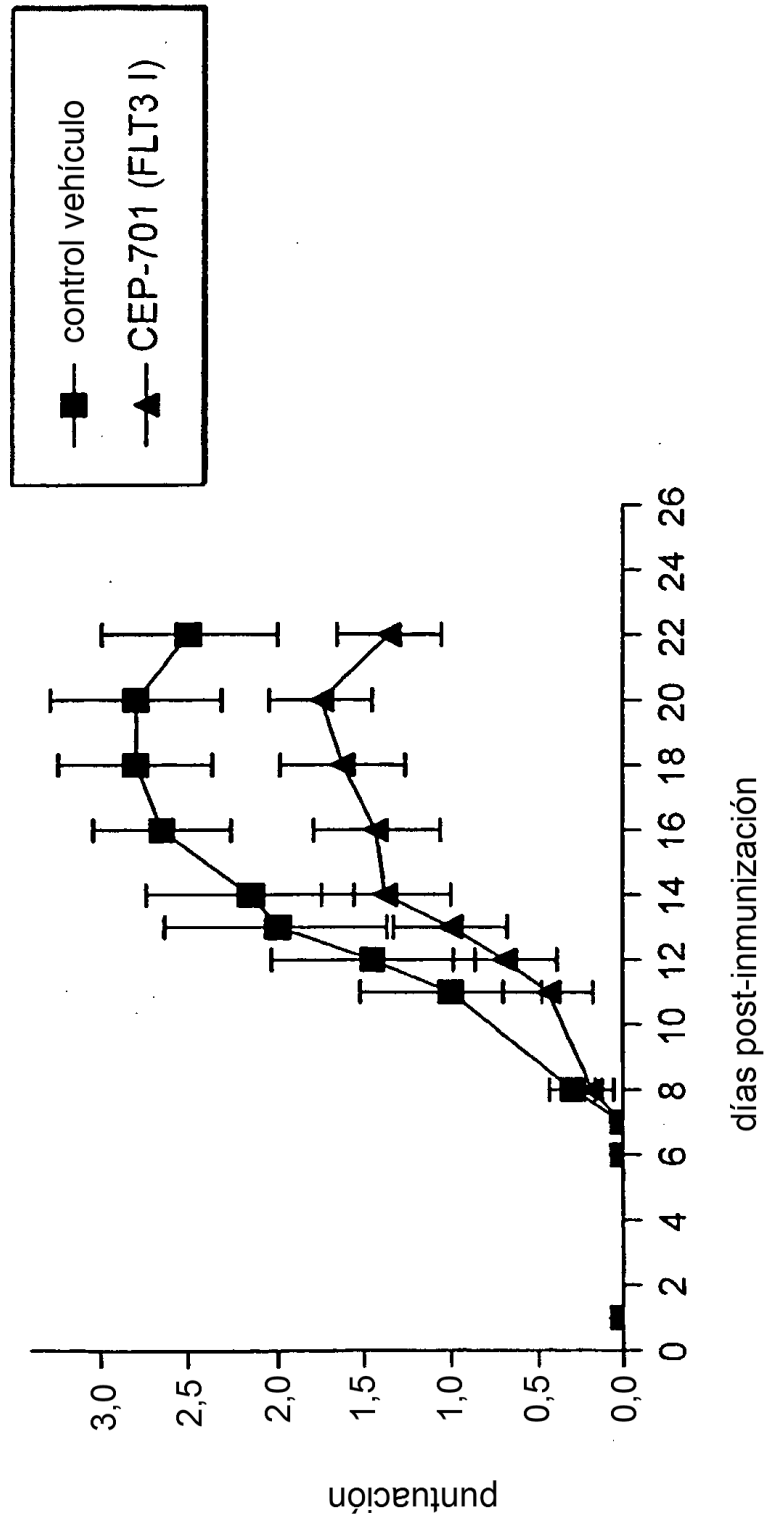


FIG. 8

57	CGAGGCGCATCCGAGGCTGGGCGCGCCCTGGGGGACGCCGGGCTCCGAGGCC	541	N I S F Y A T I G V C L L F I V V L T L
1	M P A L A R D A G T V P L L V F S A M	561	AAACATCTTATCGAAKAAATGGGTGTCTCTTCAATGTCTGTITTAACCGTG
117	ATCCGCGGTGGCGGGGACCGGCGCGCTGCTCGT		

Figura 9

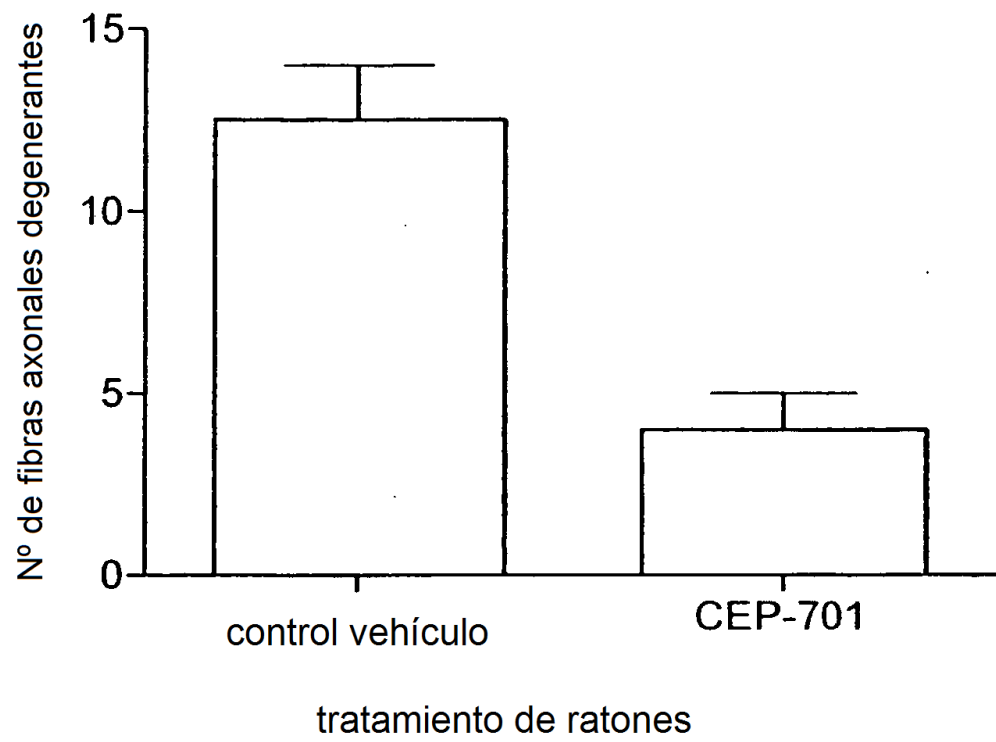


FIG. 10