

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 516**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2014 PCT/JP2014/071737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15025871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2014 E 14838211 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3037818**

54 Título: **Métodos para evaluar y cribar agonistas del receptor de S1P1**

30 Prioridad:

20.08.2013 JP 2013170383

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

16.10.2019

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)
4-16, Kyobashi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8002, JP**

72 Inventor/es:

**NINOMIYA TOMOHISA y
YOSHIDA SATOSHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 727 516 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para evaluar y cribar agonistas del receptor de S1P1

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a un método para evaluar una actividad inmunosupresora y la cardiotoxicidad de un agonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 1 (a partir de ahora en este documento mencionado como "S1P1") y un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1 que tenga una potente actividad inmunosupresora y una
10 baja cardiotoxicidad.

[Técnica anterior]

Los síntomas de muchas enfermedades autoinmunitarias se desarrollan como resultado de una respuesta inmunitaria anómala que prolifera y activa las células linfocíticas para reconocer de forma errónea el propio organismo, y atacan un determinado tejido o el cuerpo completo del propio organismo. La causa varía y no se ha revelado aún. Hasta ahora, con el objetivo de un fármaco para la supresión de la proliferación y actividad de células linfocíticas, se han desarrollado diversos inmunosupresores y se han aplicado clínicamente. Sin embargo, dichos inmunosupresores tienen efectos adversos no insignificantes debido a la actividad de supresión de proliferación celular no específica y la acción citotóxica, que hace surgir problemas.
15 20

Recientemente, Fingolimod (también conocido como FTY-720) que se ha aprobado como un fármaco contra la esclerosis múltiple recidivante-remitente ha obtenido atención como fármaco con un mecanismo novedoso porque regula la inmunidad controlando la localización de células linfocíticas sin reducir las células linfocíticas mediante muerte celular. Sin embargo, por otro lado, Fingolimod tiene un problema de que se han observado efectos adversos graves principalmente en el sistema cardiovascular, incluyendo bradicardia y arritmia cardíaca tal como un bloqueo auriculoventricular (bloqueo AV) (NPL 1, 2).
25

Un receptor de esfingosina-1-fosfato (a partir de ahora en este documento mencionado como "S1P") es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) presente en la membrana celular, y se han identificado cinco subtipos del receptor (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5; conocidos como genes de diferenciación endotelial EDG-1, EDG-5, EDG-3, EDG-6 y EDG-8). Se sabe que Fingolimod fosforilado *in vivo* (FTY-p) se une a receptores de S1P1, S1P3, S1P4 y S1P5, y actúa como agonista.
30

Las células linfocíticas circulan constantemente en la sangre en circulación y los tejidos linfoides a determinados niveles. Se sabe que un receptor de S1P1 en la membrana de las células linfoides tiene una función bastante importante cuando las células linfocíticas migran desde un tejido linfoide a la sangre en circulación. Un agonista del receptor de S1P1 representado por FTY se une principalmente a un receptor de S1P1 en las células linfocíticas e incorpora el receptor S1P1 en las células, de modo que el receptor de S1P1 en las células linfocíticas desaparece. De este modo, las células linfocíticas entonces se secuestran en tejidos linfoides secundarios, reduciendo el número de linfocitos en circulación. Como resultado, el agonista del receptor de S1P1 muestra una excelente actividad inmunosupresora (NPL 2). Mientras tanto, se cree por los estudios en roedores que la estimulación de un receptor de S1P3 expresa efectos adversos en el sistema cardiovascular tales como bradicardia (NPL, 3, 4). Por tanto, los estudios sobre un agonista del receptor de S1P1 que tiene una acción reducida sobre un receptor S1P3 han estado en progreso.
35 40 45

En dichas circunstancias, recientemente, se ha informado de un resultado de ensayo clínico respecto a BAF312 (conocido como Siponimod), un agonista selectivo para receptores de S1P1 y S1P5 (NPL 5). En el informe, se observó la acción de reducir el ritmo cardíaco como efecto adverso y el efecto de reducir el número de linfocitos en circulación como eficacia a la misma dosis. Por tanto, se ha demostrado que eliminar únicamente la acción sobre un receptor de S1P3 no puede eliminar la cardiotoxicidad en prácticas clínicas, y que al menos una parte de la acción cardiotoxica observada de Fingolimod es una toxicidad debida a un estímulo agonista para un receptor de S1P1.
50

Un receptor de S1P1 se acopla a una proteína G α supresora (a partir de ahora en este documento mencionada como "G α i"). En el corazón, G α i activada por un estímulo agonista para el receptor, junto con G $\beta\gamma$, activa el canal de potasio de rectificación interior acoplado a proteína G (a partir de ahora en este documento mencionado como "canal GIRK"). Como se expresa un completo de GIRK1 y GIRK4 en el corazón, se cree que este estímulo agonista causa cardiotoxicidad tal como bloqueo AV y reducción del ritmo cardíaco (NPL 5, 6).
55

Se informa de que S1P, que es un agonista endógeno, contra un receptor de S1P en general muestra una concentración de activación de un 50 % (valor de EC50), como actividad agonista, de aproximadamente alrededor de 10 nM aunque variando ligeramente dependiendo del método de evaluación. Por otro lado, la concentración sanguínea de S1P en una persona sana normal es varios cientos de nM, lo que indica que S1P está presente a una concentración varias decenas de veces mayor que el valor de EC50. Sin embargo, no se induce cardiotoxicidad en una persona sana normal. Hay otra contradicción: BAF312, que muestra un valor de EC50 similar, tiene una concentración sanguínea eficaz de varias decenas de nM como en caso de FTY-p, pero la cardiotoxicidad se expresa incluso a dicha baja concentración.
60 65

Como se describe anteriormente, el mecanismo de la manera en que un agonista del receptor de S1P muestra una actividad inmunosupresora como efecto principal y cardiotoxicidad como efecto adverso aún no se ha dilucidado suficientemente.

5 **[Lista de citas]**

[Documentos de patente]

[PTL 1] WO2013/094761

10

[Documentos que no son patente]

[NPL 1] Science, 296, 346-349 (2002)

[NPL 2] Journal of the American Society of Nephrology, 13 (4), 1073-1083 (2002)

15

[NPL 3] Journal of Biological Chemistry, 279 (14), 13839-13848 (2004)

[NPL 4] Molecular Pharmacology, 58, 449-454 (2000)

[NPL 5] British Journal of Pharmacology, 167, 1035-1047 (2012)

[NPL 6] Journal of Biological Chemistry, 276 (8), 5505-5510 (2001)

[NPL 7] Nature Chemical Biology, 8, 622-630 (2012)

20

[Sumario de la invención]

[Problema técnico]

25

La presente invención se ha hecho en vista de las circunstancias que se describen anteriormente. Un objeto de la presente invención es revelar un mecanismo de la manera en que un agonista del receptor de S1P muestra un efecto principal y un efecto adverso, y mejorar un método para evaluar un efecto principal y un efecto adverso de un agonista del receptor de S1P basándose en la información sobre el mecanismo. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de cribado para un agonista del receptor de S1P que tiene un fuerte efecto principal y un efecto adverso menor basándose en la información sobre el mecanismo.

30

[Solución al problema]

35

Hay un gran número de moléculas implicadas en la transducción de señales de un receptor de S1P1. Incluso si únicamente una proteína G α acoplada a un receptor de S1P1 está centrada entre estas moléculas, también hay un gran número de subtipos de la proteína G α . En dicha circunstancia, los autores de la presente invención han estudiado seriamente para conseguir los objetos anteriores. Como resultado, los autores de la invención han descubierto que la actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con la actividad selectiva medida por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con G α i2 o G α i3, y que la cardiotoxicidad de un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con la actividad selectiva medida por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con G α i1. Para ser más específicos, los autores de la presente invención han descubierto finalmente que G α i1, G α i2 y G α i3 acoplada a un receptor de S1P1 están relacionadas con la actividad inmunosupresora y la cardiotoxicidad de un agonista del receptor S1P.

40

45

Además, basándose en dichos hallazgos, los autores de la presente invención han descubierto que detectar actividades agonistas específicas para las subunidades G α acopladas (G α i1, G α i2, G α i3) hace posible evaluar la potencia de la actividad inmunosupresora y la reducción de la cardiotoxicidad de un agonista del receptor de S1P1 y, por consiguiente, cribar un agonista del receptor de S1P1 que tenga una potente actividad inmunosupresora y una baja cardiotoxicidad. Estos descubrimientos han dado lugar a completar la presente invención.

50

Por tanto, la presente invención se refiere a un método de evaluación y un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1, caracterizado por la detección de una actividad agonista específica de la subunidad G α acoplada contra un receptor de S1P1. Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente.

55

(1) Un método para evaluar la potencia de una actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de medir las actividades agonistas del agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a G α i2 y un receptor de S1P1 acoplado a G α i3, en el que si las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a G α i2 y el receptor de S1P1 acoplado a G α i3 son mayores que una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado G α i1, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.

60

(2) Un método para evaluar la potencia de una actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de medir las actividades agonistas del agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a G α i2 y un receptor de S1P1 acoplado a G α i3, en el que si la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a G α i2 y el receptor de S1P1 acoplado

65

a Gai3 es mayor que la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.

(3) Un método para evaluar una probabilidad de cardiotoxicidad mediante un agonista del receptor de S1P1, que comprende la etapa de medir la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, en el que

si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a las actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.

(4) Un método para evaluar una probabilidad de cardiotoxicidad mediante un agonista del receptor de S1P1, que comprende la etapa de medir la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, en el que

si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.

(5) Un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1, que comprende las etapas de:

(a) medir las actividades agonistas de un compuesto de ensayo contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, y

(b) seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayores que la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1.

(6) El método de acuerdo con (5), en el que un compuesto que tiene las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 30 veces o más tan elevadas como la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 se selecciona en la etapa (b).

(7) Un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1, que comprende las etapas de:

(a) medir las actividades agonistas de un compuesto de ensayo contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3; y

(b) seleccionar un compuesto que tenga la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 inferior a la de un agonista endógeno S1P y que tenga la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayor que la del agonista endógeno S1P.

Obsérvese que una secuencia de aminoácidos representativa del "receptor de S1P1" en la presente invención y la secuencia de bases de un ARNm correspondiente de la misma están registradas respectivamente como NP001391.2 y NM001400.4 en la base de datos del NCBI.

Además, una secuencia de aminoácidos representativa de "Gai1 (cuyo nombre de gen es GNAI1)" y la secuencia de bases de un ARNm correspondiente de la misma están registradas respectivamente como NP_002060.4 y NM002069.5 en la base de datos del NCBI.

Además, una secuencia de aminoácidos representativa de "Gai2 (cuyo nombre de gen es GNAI2)" y la secuencia de bases de un ARNm correspondiente de la misma están registradas respectivamente como NP_002061.1 y NM002070.2 en la base de datos del NCBI.

Además, una secuencia de aminoácidos representativa de "Gai3 (cuyo nombre de gen es GNAI3)" y la secuencia de bases de un ARNm correspondiente de la misma están registradas respectivamente como NP_006487.1 y NM006496.3 en la base de datos del NCBI.

[Efectos ventajosos de la invención]

Ha sido imposible evaluar por separado un efecto principal (eficacia) y un efecto adverso de un agonista del receptor de S1P1 por métodos convencionales para evaluar una actividad agonista. La presente invención hace posible evaluar por separado un efecto principal y un efecto adverso de un agonista del receptor de S1P1 detectando actividades agonistas contra un receptor de S1P1 mientras se distinguen los subtipos (Gai1, Gai2, Gai3) de una proteína Ga acoplada al receptor de S1P1. Además, esto hace posible cribar de forma eficaz un agonista del receptor de S1P1 excelente.

[Descripción de realizaciones]

<Método para evaluar la potencia de la actividad inmunosupresora del agonista del receptor de S1P1>

La presente invención proporciona un método para evaluar la potencia de una actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1. En los presentes ejemplos, se ha descubierto que la potencia de la actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 o un receptor de S1P1 acoplado a Gai3. Por tanto, el método de evaluación de la presente invención es un método basado en la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra al menos uno de

un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3.

En la presente invención, la "actividad inmunosupresora" puede percibirse, por ejemplo, basándose en la reducción del número de linfocitos en circulación. El número de linfocitos en circulación puede medirse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 2.

En la presente invención, puede medirse una actividad agonista específica para un subtipo de Gai, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 1 (2) (el método descrito en NPL 7). Para ser más específicos, permitiendo que las células expresen un receptor de S1P1 y un subtipo de G α particular junto con G γ 2 y G β 1, puede medirse una actividad agonista basándose en una diferencia en el porcentaje entre la proteína G α y la proteína G β causada por un agonista del receptor de S1P1.

Además, habitualmente se sabe que cuando se estimula un receptor de S1P1 con un agonista, el nivel de AMPc intracelular se regula hasta un valor inferior. Por tanto, por ejemplo, usando células que coexpresan un receptor de S1P1 y un subtipo de Gai particular, también puede medirse una actividad agonista específica del subtipo de Gai basándose en la reducción en el nivel de AMPc por un agonista del receptor de S1P1, en una condición en que se ha aumentado el nivel de AMPc intracelular usando forskolina o similar.

Además, deformar las células cambia el valor de resistencia formado en una membrana de monocapa. Se conoce un método que utiliza este fenómeno para medir un cambio en el valor de resistencia causando por la adición de un agonista del receptor de S1P1 a una monocapa cultivada de células que expresan un receptor de S1P1 en una membrana (Invest Ophthalmol Vis Sci. junio de 2005; 46 (6): 1927-33). Basándose en este método, también puede medirse una actividad agonista específica de subtipo de Gai basándose en un cambio en el valor de resistencia causado por la adición de un agonista del receptor de S1P1 a células cocultivadas que coexpresan un receptor de S1P1 y un subtipo de G α particular en una membrana, por ejemplo.

Además, es habitualmente conocido un método en que se deja que una membrana celular que expresa GPCR, un compuesto y γ -[35S]GTP reaccionen en un tampón, y después se cuantifica la cantidad del producto marcado que se une a la membrana como el valor de actividad del agonista (Life Science Volumen 74, Tema 4, 12 de diciembre de 2003, páginas 489-508). Por tanto, por ejemplo, usando una membrana celular que coexpresa un receptor de S1P1 y un subtipo de Gai particular, también puede medirse una actividad agonista específica del subtipo de Gai basándose en la acumulación de γ -[35S]GTP en la fracción de membrana por reacción de intercambio de GTP.

En una realización de la presente invención, se mide un agonista del receptor de S1P1 para las actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, y si las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 son mayores que una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.

Las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 son preferiblemente 10 veces o más, más preferiblemente 20 veces o más, y además preferiblemente 30 veces o más, tan altas como la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1.

Además, en otra realización de la presente invención, se mide un agonista del receptor de S1P1 para las actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, y si la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 es mayor que la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.

La actividad agonista del agonista endógeno S1P, que sirve como control, puede medirse cuando se miden las actividades agonistas de un agonista del receptor de S1P1, o puede usarse el valor medido por anticipado. Por ejemplo, en el caso en que se realice la medición de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 1 (2) (el método descrito en NPL 7), si el valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 es de 14 o menos, o si el valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai3 es 8 o menos, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.

<Método para evaluar la probabilidad de cardiotoxicidad por agonista del receptor de S1P1>

La presente invención proporciona un método para evaluar una probabilidad de cardiotoxicidad por un agonista del receptor de S1P1. En los presentes ejemplos, se ha descubierto que la probabilidad de cardiotoxicidad por un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1. Por tanto, el método de evaluación de la presente invención es un método basado en una actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1.

En la presente invención, la "cardiotoxicidad" puede percibirse, por ejemplo, basándose en el bloqueo AV o la

reducción del ritmo cardíaco. El bloqueo AV puede medirse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 3. Mientras tanto, el método para medir una actividad agonista específica del subtipo de Gai en la presente invención es como se describe anteriormente.

5 En una realización de la presente invención, se mide un agonista del receptor de S1P1 para una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1 y si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a las actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.

10 La actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es preferiblemente 1/10 a menos, más preferiblemente 1/20 o menos, y además preferiblemente 1/30 o menos, de las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3.

15 Además, en otra realización de la presente invención, se mide un agonista del receptor de S1P1 para una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1 y, si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.

20 La actividad agonista del agonista endógeno S1P, que sirve como control, puede medirse cuando se miden la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1, o puede usarse el valor medido por anticipado. Por ejemplo, en el caso en que se realiza la medición de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 1 (2) (el método descrito en NPL 7), si el valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es más de 261, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.

25 <Método de cribado para agonista del receptor de S1P1>

La presente invención proporciona un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1. En los presentes ejemplos, se ha revelado que la actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con la selectividad por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con Gai2 o Gai3 (la actividad selectiva medida por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con Gai2 o Gai3) y que la cardiotoxicidad de un agonista del receptor de S1P1 se correlaciona con la selectividad por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con Gai1 (la actividad selectiva medida por células que expresan una combinación de un receptor de S1P1 con Gai1). El método de cribado de la presente invención utiliza dichas correlaciones.

35 El compuesto de ensayo usado en el cribado no está particularmente limitado. Es posible usar, por ejemplo, una colección de compuestos sintéticos de bajo peso molecular, un producto de expresión de una genoteca, una colección de péptidos, un anticuerpo, una sustancia liberada de una bacteria, un extracto líquido o un sobrenadante de cultivo de células (microorganismos, células vegetales, células animales), un polipéptido purificado o parcialmente purificado, un extracto derivado de un organismo marino, planta o animal, o una colección de presentación de péptidos en fagos aleatoria. Mientras tanto, el método para detectar una actividad agonista específica del subtipo de Gai es como se describe anteriormente.

45 En una realización de la presente invención, se mide un compuesto de ensayo para actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, para seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayor que la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1.

50 Es preferible seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 10 veces o más, más preferiblemente para seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas 20 veces o más, y además preferiblemente para seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas 30 veces o más, tan altas como la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1.

55 Además, en otra realización de la presente invención, se mide un compuesto de ensayo para actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, para seleccionar un compuesto que tenga la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 inferior a la de un agonista endógeno S1P y que tenga la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayor que la del agonista endógeno S1P.

60 Las actividades agonistas del agonista endógeno S1P, que sirve como control, pueden medirse cuando se miden las actividades agonistas del compuesto de ensayo, o pueden usarse los valores medidos por anticipado. Por ejemplo, en el caso donde la medición se realiza de acuerdo con el método descrito en el presente ejemplo 1 (2) (el método descrito en NPL 7), se selecciona un compuesto cuyo valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es más de 261, y cuyo valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 es 14 o menos o el valor de EC50 (nM) de la actividad agonista contra un receptor de S1P1

acoplado a Gai3 es 8 o menos. El compuesto así seleccionado se considera que muestra una potente actividad inmunosupresora y tiene una baja cardiotoxicidad.

[Ejemplos]

5 A partir de ahora en este documento, la presente invención se describirá más específicamente basándose en los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

10 (Ejemplo 1) Evaluación de agonista del receptor de S1P1 para la actividad inmunosupresora

(1) Evaluación general para la actividad agonista del receptor de S1P1

15 Como método general para evaluar una actividad agonista del receptor de S1P1, se ha conocido un método que usa células CHO que expresan un receptor de S1P1 y similares para medir una actividad agonista basándose en la unión al receptor y una actividad de transducción de señales a través de la unión (PLT 1). S1P, FTY-p, BAF312, un compuesto descrito en el ejemplo 48 de la patente europea n.º 1826197 (a partir de ahora en este documento mencionado como "compuesto A") y un compuesto descrito en el ejemplo 2 de PLT 1 (a partir de ahora en este documento mencionado como "compuesto B") se midieron para las actividades agonistas del receptor de S1P1 de acuerdo con el método descrito en el ejemplo experimental 1 de PLT 1. Como resultado, las actividades agonistas del receptor de S1P1 fueron respectivamente 6,4 nM, 0,08 nM, 3,0 nM, 0,3 nM y 9,2 nM.

(2) Evaluación de actividades agonistas del receptor de S1P1 específico de subtipo de proteína G α

25 A continuación, se evaluaron las actividades agonistas del receptor de S1P1 específico del subtipo de proteína G α de acuerdo con el método descrito en NPL 7. Obsérvese que las condiciones de expresión seguían la sección de "Métodos complementarios" en NPL 7, y las condiciones de medición seguían la sección de "Medición de la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia."

30 En primer lugar, se permitió que células HEK 293T coexpresaran un receptor de S1P1, un subtipo particular de G α (Gai1, Gai2 o Gai3), Gy2 y G β 1. Después, basándose en una diferencia en el porcentaje entre la proteína G α y la proteína G β causada por el agonista endógeno S1P, se midió la actividad agonista. Como resultado, S1P tuvo una concentración de activación del 50 % (valor de EC50) de 261 nM en la condición donde se expresaba Gai1, 14,6 nM en la condición donde se expresaba Gai2, y 8,4 nM en la condición donde se expresaba Gai3.

35 A continuación, en las mismas condiciones de ensayo, FTY-p, BAF312, el compuesto A y el compuesto B tuvieron respectivamente un valor de EC50 de 17,6 nM, 122 nM, 98 nM y 640 nM en la condición donde se expresaba Gai1; respectivamente, aproximadamente 100 nM, 81 nM, 11 nM y 6 nM en la condición donde se expresaba Gai2; y, respectivamente, 0,94 nM, 27 nM, 85 nM y 19 nM en la condición donde se expresaba Gai3 (tabla 1).

[Tabla 1]

	S1P1-Gai1	S1P1-Gai2	S1P1-Gai3
S1P	261	14,6	8,4
FTY-p	17,6	100	0,94
BAF312	122	81	27
Compuesto A	98	11	85
Compuesto B	640	6	19
CE50 (nM)			

45 Este resultado reveló que FTY-p, BAF312 y el compuesto A tenían una fuerte actividad contra Gai1 y una baja selectividad por Gai2 o Gai3. Por otro lado, se reveló que el compuesto B tenía una débil actividad contra Gai1 y altas selectividades por Gai2 y Gai3. Puede concluirse que el compuesto B es un agonista altamente sesgado de modo que el sesgo en la actividad observado en S1P se aumenta adicionalmente.

(Ejemplo 2) Evaluación de eficacia de agonistas del receptor de S1P1

50 BAF312 o el compuesto B se administró por vía oral a ratas SD macho a diferentes dosis. Después de 3, 6 y 24 horas, se contó el número de células linfocíticas en la sangre usando un contador de células sanguíneas. Como resultado, en ambos casos, el número de linfocitos se estaba suprimiendo significativamente 6 horas después de la administración, y los efectos se observaron en 24 horas.

Las dosis para suprimir el número de células linfocíticas en un 50 % (ED50) después de 6 horas y 24 horas fueron

respectivamente 0,1 mg/kg y >1 mg/kg para BAF312 y 0,17 mg/kg y 0,65 mg/kg para el compuesto B. Como resultado del cálculo de la concentración sanguínea eficaz después de 24 horas, fue >208 nM para BAF312 y 176 nM para el compuesto B.

5 (Ejemplo 3) Evaluación de cardiotoxicidad del agonista del receptor de S1P1

10 Se examinaron los niveles de expresión de cardiotoxicidad en cobayas con anestesia como modelo de evaluación de cardiotoxicidad usando BAF312 y el compuesto B que mostraba una concentración sanguínea eficaz casi equivalente a la misma. En este modelo, los cobayas usados eran altamente sensibles a un receptor de S1P1 y, además, el modelo tenía capacidad de detección fiable de cardiotoxicidad dependiente del receptor de S1P1 en anestesia. Se fijó un electrocardiógrafo y un dispositivo de marcapasos a los cobayas macho cuyas respiraciones estaban controladas artificialmente con anestesia y se administraron los fármacos.

15 Como resultado, cuando se administraba 0,01 mg/kg de BAF312 por infusión durante 10 minutos, se expresaba bloqueo AV completo en cuatro de los cuatro casos, y el bloqueo AV completo continuaba en todos los casos hasta que había transcurrido 1 hora.

20 Por otro lado, cuando el compuesto B se administraba en las mismas condiciones, no se observaba expresión de bloqueo AV completo en ninguna de los cuatro casos.

Además, las concentraciones sanguíneas de BAF312 y el compuesto B cuando se completaban la administración, eran respectivamente 17 nM y 91 nM. Las concentraciones sanguíneas después de 1 hora eran respectivamente <4 nM y 27 nM. Este hecho reveló que el compuesto B que tiene una actividad sesgada más fuerte era un compuesto con la cardiotoxicidad más débil aunque la concentración sanguínea era mayor.

25 **[Aplicabilidad industrial]**

30 La presente invención hace posible cribar de forma eficaz un agonista del receptor de S1P1 excelente evaluando por separado un efecto principal (eficacia) y un efecto adverso del agonista del receptor de S1P1. Por lo tanto, la presente invención puede contribuir en gran medida a los campos de desarrollo farmacéutico y evaluación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la potencia de una actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de
5 medir las actividades agonistas del agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, en el que
si las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 son mayores que una actividad agonista contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.
10
2. Un método para evaluar la potencia de una actividad inmunosupresora de un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de
medir las actividades agonistas del agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, en el que
15 si la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 es mayor que la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como capaz de mostrar una potente actividad inmunosupresora.
3. Un método para evaluar una probabilidad de cardiotoxicidad mediante un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de
20 medir la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, en el que
si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a las actividades agonistas contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.
25
4. Un método para evaluar una probabilidad de cardiotoxicidad mediante un agonista del receptor de S1P1, que comprenden la etapa de
30 medir la actividad agonista de un agonista del receptor de S1P1 contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, en el que
si la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 es inferior a la de un agonista endógeno S1P, el agonista del receptor de S1P1 se evalúa como menos probable de causar cardiotoxicidad.
5. Un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1, que comprende las etapas de:
35 (a) medir las actividades agonistas de un compuesto de ensayo contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3; y
(b) seleccionar un compuesto que tenga las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayores que la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1.
40
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que un compuesto que tiene las actividades agonistas contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 30 veces o más tan elevadas como la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 se selecciona en la etapa (b).
45
7. Un método de cribado para un agonista del receptor de S1P1, que comprende las etapas de:
(a) medir las actividades agonistas de un compuesto de ensayo contra un receptor de S1P1 acoplado a Gai1, un receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y un receptor de S1P1 acoplado a Gai3; y
50 (b) seleccionar un compuesto que tenga la actividad agonista contra el receptor de S1P1 acoplado a Gai1 inferior a la de un agonista endógeno S1P y que tenga la actividad agonista contra al menos uno del receptor de S1P1 acoplado a Gai2 y el receptor de S1P1 acoplado a Gai3 mayor que la del agonista endógeno S1P.