



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 790**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05850751 .8**

(96) Fecha de presentación : **13.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1828779**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

(54) Título: **Procedimiento para la identificación de los moduladores de la actividad de los receptores de canales iónicos.**

(30) Prioridad: **13.12.2004 US 635007 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

(73) Titular/es: **Centre National de la Recherche
Scientifique - CNRS
3, rue Michel Ange
75016 Paris Cédex 16, FR**

(72) Inventor/es: **Boue-Grabot, Eric;
Cazalets, Jean-René y
Toulme, Estelle**

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

Procedimiento para la identificación de los moduladores de la actividad de los receptores de canales iónicos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor con canales iónicos, tal como un receptor GABA, midiendo el flujo de calcio a través del receptor P2X en presencia de su agonista ATP cuando se acopla a dicho receptor con canales iónicos en células que expresan conjuntamente de forma recombinante estos dos receptores. La invención se refiere además a un kit o a un dispositivo que contiene elementos esenciales para llevar a cabo el procedimiento según la invención. Por último, la presente invención se refiere a la utilización de dichos compuestos seleccionados para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con dicha disfunción del receptor con canales iónicos.

10 Los receptores ácido gamma-aminobutírico (GABA) son glucoproteínas intrínsecas de la membrana en tejidos neuronales de mamífero que son miembros de la superfamilia de receptores con canal iónico regulados por ligando (denominados "receptores con canales iónicos" en la presente descripción). Los receptores GABA ejercen una función principal en la inhibición de la actividad neuronal del sistema nervioso central (SNC) debido a la distribución extendida de neuronas que liberan GABA y receptoras de GABA.

15 Los receptores GABA pueden dividirse en dos clases principales: los subtipos de receptor GABA-A y GABA-C, y los tipos de receptor GABA-B, que se distinguen por las diferencias en los mecanismos efectores y en la farmacología. Los receptores GABA-A y GABA-C son canales de cloruro accionados por transmisores que son activados por GABA para abrir su canal de cloruro.

20 Los canales del receptor GABA, proteínas que están presentes en la superficie de las neuronas, son los principales receptores inhibidores del sistema nervioso central y se componen de cinco subunidades que se ensamblan para formar un canal, que es permeable a los aniones, principalmente los iones cloruro.

25 Existen 6 subunidades alfa, 3 subunidades beta, 3 gamma, 1 épsilon, 1 delta, 1 pi y 3 subunidades rho. Se cree que la mayoría de los receptores GABA-A se forman por asociación de 2 subunidades alfa, 2 beta y 1 gamma, si bien son posibles otras combinaciones. Todas estas combinaciones dan como resultado receptores con diferentes propiedades. Todas estas subunidades presentan una configuración similar, con un gran dominio extracelular, 4 dominios transmembranarios y un dominio intracelular mayor que conecta los dominios transmembranarios M3 y M4.

30 Las corrientes eléctricas producidas por los movimientos de los iones a través de estos complejos receptores con canales de iones son bajas y no permiten la utilización directa de sonda fluorescente para cuantificar este flujo de iones cloruro a las células. El procedimiento y el dispositivo que permiten los registros electrofisiológicos de estas corrientes son complejos. Por ejemplo, es necesario además imponer un voltaje constante y actuar en una sola célula.

35 Entonces, este procedimiento que utiliza registros electrofisiológicos no puede utilizarse para realizar la identificación primaria de compuestos que pueden modular dichos canales receptores, compuesto que podría ser de gran interés en el campo farmacéutico.

40 Los receptores P2X son canales iónicos cerrados al ligando mientras que los demás "receptor P2", receptores P2Y, actúan generalmente a través de un sistema acoplado a la proteína G. Varios subtipos (P2X1-P2X7) de receptor P2X forman canales homómeros o heterómeros que son permeables a los cationes, incluyendo el calcio y que están específicamente activados por ATP extracelular, su agonista. Este receptor funciona como canal iónico cerrado al ligando con permeabilidad relativamente elevada al calcio (Egan *et al.*, *Neurosciences*, 24(13):3413-3420, 2004). Los receptores P2X median en la despolarización de la membrana y en el flujo de Ca^{++} y tienen una función fisiológica que comprende desde la transmisión sináptica excitante rápida, la recepción del dolor a la vasoconstricción de vasos. Mediante los receptores P2X, ATP actúa como neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central y periférico.

45 Utilizando los registros electrofisiológicos (es decir midiendo las corrientes resultantes del paso de iones a través de los canales abiertos), se ha demostrado ya que los receptores GABA y los receptores P2X están funcional y físicamente acoplados cuando se expresan conjuntamente en un sistema de expresión heterólogo (ovocitos de *Xenopus*, células transfectadas de mamífero o neuronas que expresan ambas familia de receptores) (Boué-Grabot *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 279: 6967-6975, 2004; Boué-Grabot *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 279: 52519-52525, 2004).

50 Puede asimismo mencionarse el documento de Sokolova *et al.* (*J. of Neurosci.* 2001, 21(14): 4958-68) que da a conocer la inhibición dependiente de la interacción entre los receptores P2x3 y GABA (A) expresados en las neuronas de los ganglios de la espina dorsal de rata por un método de electrofisiología.

55 Se ha demostrado también que P2X interactúa también con los receptores nicotínicos de acetilcolina y los receptores de 5-HT3.

Entonces, resulta deseable proporcionar un procedimiento eficaz, no costoso y fácil de llevar a cabo, que puede utilizarse por detección de alto rendimiento, para seleccionar el compuesto que puede modular la actividad del receptor de canales iónicos tal como el receptor GABA.

Este es el objetivo de la presente invención.

Sorprendentemente, se ha demostrado que la activación de los receptores GABA-A reduce directamente el flujo de calcio mediante los receptores P2X abiertos, medida utilizando una sonda de calcio fluorescente.

Se ha observado también por registros electrofisiológicos que:

- cuando ATP y GABA se aplican conjuntamente, la corriente observada es inferior a la suma de las corrientes individuales, lo que demuestra que los dos receptores presentan inhibición recíproca cuando se activan conjuntamente. Esta inhibición funcional se basa en el acoplamiento molecular de los receptores en sus respectivos dominios intracelulares. Se ha observado también que las proteínas de cada receptor no se alteran por la presencia del otro tipo de receptor. De este modo, la presencia del receptor P2X no modifica las propiedades del receptor GABA con respecto a su agonista (GABA). La presencia del receptor GABA no modifica las propiedades del receptor P2X con respecto a su agonista (ATP). Solamente la amplitud de la respuesta de cada receptor disminuye cuando se activan simultáneamente.
- todos los receptores GABA (GABA-A, independientemente de su composición molecular y GABA-C) inhiben los receptores P2X2, tal como P2X en activación conjunta;
- las respuestas de los receptores P2X2 a ATP son estables durante la aplicación (no se insensibilizan) y a lo largo del tiempo (buena recuperación). Pueden utilizarse para analizar muchos compuestos rápidamente utilizando una sola célula ; y
- los receptores P2X activados por ATP median en un flujo notable de calcio en una célula mantenida en su reposo potencial.

Por lo tanto, expresando conjuntamente los receptores GABA y P2X en un modelo celular, la activación de los receptores GABA procederá a la modificación de la intensidad de fluorescencia de la respuesta de los receptores P2X provocada por ATP, o cualquier otro de los agonistas P2X bien conocidos.

Así que, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, en el dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) presentar las células recombinantes que expresan de manera recombinante dicho receptor de canales iónicos y un receptor P2X;
- b) poner en contacto dichas células recombinantes con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, preferentemente tal como ATP, o en presencia de un agonista de dicho receptor P2X y el agonista de dicho receptor de canales iónicos;
- c) medir el flujo de calcio mediante el receptor P2X;
- d) comparar la medida obtenida en la etapa c) con la medida obtenida en las mismas condiciones para un primer control de referencia en el que en la etapa b) el compuesto que va a analizarse no está presente; y
- e) seleccionar o identificar dicho compuesto como un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, si la comparación en la etapa d) demuestra un aumento o disminución significativas del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto.

Si no se conoce inicialmente la estructura del compuesto analizado o seleccionado, su estructura podría identificarse por los procedimientos de identificación de estructuras conocidos por los expertos, tales como espectrometría de masas o U.V., LC-MS, secuenciado, ... tras la etapa e) del procedimiento anterior para seleccionar o identificar el compuesto de la presente invención.

En una forma de realización preferida, las células recombinantes utilizadas en la etapa a) no expresan endógenamente un receptor que puede ser mutado por un agonista de dicho receptor P2X, preferentemente tal como ATP, o por un agonista de dicho receptor de canales iónicos, tal como GABA si dicho receptor de canales iónicos es el receptor GABA.

En una forma de realización más preferida, las células recombinantes utilizadas en la etapa a) son ovocitos, que no

expresan endógenamente receptores activados por GABA o un agonista de dicho receptor P2X preferentemente tal como ATP.

5 Preferentemente, las células recombinantes utilizadas en la etapa a) son células de mamífero u ovocitos de *Xenopus*. Resulta más preferido que el modelo celular (células de mamífero u ovocitos de *Xenopus*) exprese conjuntamente el receptor GABA de interés y el receptor P2X en modo estable o temporal.

Preferentemente, dichas células de mamífero son humanas, de rata o ratón.

10 Por receptor P2X, se quiere designar en la presente descripción, un receptor P2X natural que tiene como secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos natural de un receptor P2X de mamífero o de un receptor P2X mutado de mamífero que puede interactuar con dicho receptor de canales iónicos.

15 Entre dichos receptores P2X, resultan preferidos los receptores P2X que se seleccionan de entre el grupo constituido por la subunidad del receptor P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 o P2X7 o cualquier receptor P2X que proceda de una asociación o una combinación de subunidades de receptor P2X que pueden ejercer una función de receptor de canal activado por ATP.

20 Se cree que los receptores P2X comprenden polímeros de polipéptidos receptores, polímeros que pueden ser del mismo o diferente subtipos. Por lo tanto, la expresión "receptor P2X" se refiere, cuando procede, a cada una de la subunidad o subunidades receptoras individuales, así como a los receptores homoméricos o heteroméricos comprendidos por éstos.

25 Según un aspecto específico asimismo, dicho receptor de canales iónicos o dicho receptor P2X es de origen humano, de rata o ratón.

La secuencia de aminoácidos (o de ARNm) de estos subtipos de receptor P2X (denominado también P2RX) son también conocidos por los expertos y pueden encontrarse, por ejemplo, en Data Bank, tal como en Genbank con el número de referencia siguiente (véase Tabla 1):

30 Tabla 1: Ejemplos de número de referencia en GenBank indicaban la secuencia completa de subtipos de receptor P2X, o variantes de corte y empalme de la misma, de origen de rata, ratón y humano

Subtipos P2XR	Rata	Ratón	Humano
P2X1	X80477	NM008771	AF020498; U45448; AF078925
P2X2	U14414; NM_053656; AF013241; AF020759; AF020758; AF020757; AF020756; Y10473; Y10474; Y10475	NM_153400; AB094664; AY044240; AB094663	NM174873; NM174872; NM012226; NM170683; NM170682; NM016318
P2X3	AF084975; X91167; X90651; NM_031075	NM_145526	Y07683; AB016608
P2X4	X91200; U87270; U32497; X93565	AF089751; AF089752; AF146516	AF012903; U83993; Y07684; AF000234
P2X5	X92069 ; X97328	NM_033321	U49395; AF016709; AF070573; U49396
P2X6	X97376 ; X92070	AB010883	XM496501
P2X7	NM_019256	AJ009823	Y09561; Y12851

35 Por un agonista de receptor P2X, se quiere designar en la presente invención, uno de los agonistas receptores bien conocidos por los expertos, tales como ATP, α, β mATP (alfabeta-metileno ATP), benzoilbenzoico ATP (tal como los isómeros 2' y 3' mezclados o 2',3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP (BzATP)) o 2-metiltio-ATP (2-MeSATP), (Zhao *et al.*, J Pharmacol Exp Ther., 311(3):1211-7, 2004; Bianchi *et al.*, Eur J Pharmacol. 2;376(1-2):127-38, 1999; Gendron *et al.*, J. Neurochem., 87(2):344-52, 2003), siendo el ATP el agonista más preferido del receptor P2X.

40 En una forma de realización preferida, dicho receptor de canales iónicos se selecciona de entre el grupo constituido por el receptor GABA, el receptor glicina, el receptor acetilcolina o el receptor serotonina (receptor 5-HT3), siendo el receptor GABA el más preferido.

45 Mediante receptor GABA de canales iónicos, se hace referencia al receptor GABA de canales iónicos resultante de la asociación homomérica o heteromérica entre cualquier subunidad del receptor GABA, seleccionándose dicha subunidad de entre el grupo de la subunidad del receptor GABA constituido por 1 a 6 subunidades de alfa, 1 a 3 de beta, 1 a 3 de gamma, 1 a 3 subunidades de épsilon, delta, pi, theta, y rho, y formando dicha asociación homomérica o heteromérica un receptor de canales iónicos que puede ser activado por GABA.

50 La secuencia de aminoácidos (o de ARNm) de estas subunidades de receptor GABA es bien conocida por los

expertos y podían encontrarse, por ejemplo, en Data Bank, tal como en Genbank, con el número de referencia siguiente (véase Tabla 2):

5 Tabla 1: Ejemplos de número de referencia en GenBank describían la secuencia completa de la subunidad del receptor GABA ("GABAR"), o variantes de corte y empalme de la misma, de origen de rata, ratón y humano

Subunidades GABAR	Rata	Ratón	Humano
Alfa1	L08490	M86566; M57519	X14766
Alfa2	L08491	M86567; M57520	S62907
Alfa3	L08492	M86568; M57521	S62908
Alfa4	L08493		U30461
Alfa5	L08494	NM176942	L08485
Alfa6	L08495	X51986	S81944
Beta1	X15466	U14418; G755155	X14767
Beta2	X15467	NM008070	S67368
Beta3	X15468	NM008071	M82919
Gamma1	X57514	NM010252	
Gamma2	L08497	M62374	X15376
Gamma3	X63324	X59300	AF269144
Épsilon	NM023091; AF255612	NM017369; AF18926	Y07637
Delta	L08496	NM008072	AF016917
Theta	NM031733	AF189260; NM020488	AF189259; AF14468
Pi		NM146017	U95367
Rho1	X95579; U21070	NM008075	M62400; M62323;
Rho2	D38494	NM008076	M86868
Rho3	D50671	XM484554	

10 Cuando el receptor con canales iónicos es el receptor GABA, el agonista de dicho receptor de canales iónicos es GABA o cualquier otro agonista del receptor GABA, tal como el muscimol e la isoguvacina.

En el procedimiento según la presente invención, el aflujo de calcio medido en la etapa c) se mide con una sonda de calcio fluorescente, tal como verde calcio, Fluo-3 o Fluo-4, sonda de calcio fluorescente.

15 En una forma de realización preferida, dicho compuesto que va a analizarse es analizado por su capacidad para interactuar específicamente con dicho receptor P2X. Dicha interacción específica puede demostrarse midiendo si se obtiene un aumento o disminución significativo del aflujo de calcio en las mismas condiciones para un segundo control de referencia en el que en la etapa a) las células recombinantes utilizadas para dicho segundo control de referencia expresan a dicho receptor P2X y no expresan a dicho receptor de canales iónicos.

20 Particularmente, dicho compuesto que va a analizarse no se seleccionará si se observa un aumento o disminución del aflujo de calcio en las células recombinantes para dicho segundo control de referencia.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar o identificar un agonista de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

25 A) seleccionar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos por un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto como un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos según la invención, en el que en la etapa b) dichas células recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse solamente en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, tal como ATP; y

30 B) selección de dicho compuesto como agonista si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según la presente invención demuestra que se observa una disminución significativa del aflujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos para el primer control de la referencia.

35 Resulta además preferido un procedimiento para seleccionar o identificar un agonista de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

40 A) seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos por un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos según la presente invención, en el que en la etapa b) dichas células recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, tal como ATP; y el agonista de dicho receptor de canales iónicos; y

B) selección de dicho compuesto como modulador positivo si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según la presente invención demuestra que se observa una disminución significativa del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos en el primer control de la referencia.

En una forma de realización más preferida, en el procedimiento para seleccionar o identificar un modulador positivo de un receptor de canales iónicos según la presente invención, el agonista del receptor de canales iónicos se utiliza a una concentración no saturada en la etapa b) del procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos según la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar o identificar un modulador negativo, a un inhibidor o un agonista de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

A) seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de dicho receptor de canales iónicos por un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos según la presente invención, en el que en la etapa b) dichas células recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, tal como ATP; y el agonista de dicho receptor de canales iónicos; y

B) seleccionar dicho compuesto como modulador positivo si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según la presente invención demuestra que se observa un aumento significativo del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos en el primer control de la referencia.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, un agonista, un modulador positivo o negativo, según la presente invención en el que las mismas células recombinantes utilizadas para analizar un primer compuesto puede utilizarse para analizar un segundo compuesto que debe analizarse. Ciertamente, las respuestas de los receptores P2X2 a su agonista, tal como ATP, son estables durante la aplicación (no insensibilizan) y a lo largo del tiempo (buena recuperación). Por lo tanto pueden utilizarse para analizar muchos compuestos rápidamente utilizando una sola célula.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la selección de un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, en el que dicho kit comprende:

- las células que expresan conjuntamente de modo recombinante un receptor de canales iónicos y un receptor P2X, u, opcionalmente, medios para obtener células recombinantes;
- ATP o cualquier otro agonista P2XR tales como α, β mATP (alfabeta-metileno ATP), benzoilbenzoico ATP (tal como los isómeros 2' y 3' mezclados o 2',3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP (BzATP)) o 2-metiltio-ATP (2-MeSATP);
- opcionalmente, un agonista de dicho receptor de canales iónicos, tal como GABA;
- opcionalmente, una sonda de calcio, preferentemente una sonda de calcio fluorescente, tal como un marcador para medir el flujo de calcio en dichas células recombinantes; y
- opcionalmente, un sistema para medir la fluorescencia tal como Video microscopia o el ensayo con Registrador de placas de imágenes de fluorescencia (FCIPR).

En el kit según la presente invención, dicho receptor de canales iónicos, receptor P2X, células recombinantes y sonda de calcio se seleccionan independientemente entre éstos como se definió anteriormente para el procedimiento de la invención destinado a seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos.

Es asimismo descrito un dispositivo o sistema, pudiendo ser dicho sistema utilizado mediante un cribado de alto rendimiento (HTS) para la selección de un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, en el que dicho dispositivo comprende los elementos esenciales como se han definido anteriormente para el procedimiento o el kit de la invención para la selección de un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos.

La presente invención puede utilizarse para seleccionar compuestos que pueden activar, modular o inhibir el receptor de canales iónicos, tales como los receptores GABA, acoplados funcionalmente con el receptor P2X, midiendo indicadores de calcio, particularmente con una sonda de calcio fluorescente que puede medir el flujo de calcio por el receptor P2X.

En un aspecto final, se describe el nuevo compuesto o se selecciona el compuesto o se identifica por los procedimientos para seleccionar o para identificar según la invención como se definió anteriormente, estos nuevos compuestos o los compuestos ya conocidos que están recién identificados como moduladores, tal como el modulador agonista, positivo o negativo, de la actividad de un receptor de canales iónicos, siendo dicho receptor de canales iónicos preferentemente un receptor que puede interactuar funcionalmente con receptores P2X, tales como los receptores GABA, glicina, serotonina y acetilcolina.

Dichos nuevos compuestos o los compuestos ya conocidos son compuestos que están recién identificados como moduladores, después de la actividad del receptor GABA, particularmente el receptor GABA-A, y se seleccionan o identifican por el procedimiento según la presente invención, en el que en dicho procedimiento, dicho receptor de canales iónicos es un receptor GABA, concretamente el receptor GABA-A.

Se da a conocer también la utilización de dicho compuesto para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, trastornos en animales, incluyendo el hombre, que están relacionados con el receptor de canales iónicos que pueden interactuar funcionalmente con receptores P2X.

Este compuesto puede ser utilizado para la prevención o el tratamiento, o para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento, de enfermedades, trastornos o afecciones en mamíferos, incluyendo el hombre, que están relacionados con receptores de canales iónicos que pueden interactuar funcionalmente con los receptores P2X. Más preferentemente, dichos enfermedad, trastorno o afección están relacionados con la disfunción del receptor GABA-A.

Cuando dicha enfermedad, trastorno o afección se refiere a la disfunción del receptor GABA, particularmente la disfunción de GABA-A, resultan preferidos una enfermedad, un trastorno o una afección seleccionados de entre el grupo constituido por asma, insuficiencia cardíaca aguda, hipotensión, retención urinaria, osteoporosis, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, úlceras, alergias, hipertrofia benigna de próstata, cáncer de próstata, enfermedad de Parkinson, trastornos psicóticos y neurológicos, ansiedad, esquizofrenia, manía, depresión, discinesia, trastornos de la memoria, trastornos del sueño, trastornos convulsivos o epilepsia.

Estos nuevos compuestos identificados utilizando la presente invención serán útiles en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y trastornos en mamíferos, incluyendo el hombre. Haciendo referencia concretamente al receptor GABA, estos nuevos compuestos identificados utilizando la presente invención serán útiles en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y trastornos tales como la disfunción: asma, hipotensión, hipertensión, retención urinaria, angina de pecho, infarto de miocardio, úlceras, alergias, enfermedad de Parkinson, trastornos neurológicos, ansiedad, esquizofrenia, depresión, discinesia, trastornos cognitivos, trastornos del sueño, trastornos convulsivos y epilepsia.

Un compuesto de ensayo identificado utilizando los procedimientos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un paciente, preferentemente a un mamífero, más preferentemente a un ser humano, que padece una enfermedad cuya evolución está asociada a una carencia o a una permeabilidad excesiva de los canales iónicos formados por el receptor de canales iónicos que puede interactuar funcionalmente con receptores P2X, tales como los receptores GABA, glicina, serotonina y acetilcolina. Tal como se utiliza en la presente memoria "tratamiento" se refiere a la mejora de una enfermedad, o por lo menos a un síntoma discernible de la misma o a una mejora de por lo menos un parámetro físico medible, no necesariamente discernible por el paciente o para retardar el comienzo de la enfermedad. Tal como se utiliza en la presente memoria, "prevención" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad. El paciente puede tener una predisposición genética a una enfermedad, tal como antecedentes familiares de la enfermedad, o una predisposición no genética a la enfermedad.

Cuando se administra a un paciente, un compuesto de ensayo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra preferentemente como componente de una composición que comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede administrarse por vía oral, o por cualquier otra vía conveniente, y puede administrarse junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser general o local. Se conocen varios sistemas de suministro, por ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden utilizarse para administrar el compuesto seleccionado de la presente invención o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los procedimientos de administración comprenden de manera no limitativa las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal epidural, bucal, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación o tópica. El modo de administración se deja a criterio del médico. En la mayoría de los casos, la administración producirá la liberación de un compuesto de ensayo o una sal farmacéuticamente aceptable en el torrente sanguíneo.

Las composiciones que comprenden un compuesto de ensayo se seleccionan por los procedimientos según la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden contener además un compuesto

adecuado de un vehículo farmacéuticamente aceptable con el fin de proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora o incluido por una farmacopea nacional o reconocida para su utilización en animales, mamíferos y más concretamente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra un compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, gelatina, almidón y similares. Además pueden utilizarse agentes adyuvantes, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente en soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen también excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y similares. Las composiciones del compuesto de ensayo, si se desea, pueden contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH. Las composiciones de la invención que comprenden el compuesto seleccionado pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, líquidos que contiene cápsulas, polvos, formulación de liberación lenta, supositorios, emulsiones, aerosoles, atomizadores, suspensiones o cualquier otra forma adecuada para su utilización. Dicha composición se formula generalmente según los procedimientos de rutina como composición farmacéutica adaptada a seres humanos para administración oral o para administración intravenosa. La cantidad del compuesto seleccionado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que sea eficaz en el tratamiento de una enfermedad específica dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse por técnicas clínicas habituales. Además, pueden utilizarse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar intervalos de dosis óptimos. La dosis exacta que debe utilizarse dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad, y debería decidirse según el criterio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados para administración oral, intranasal, intradérmica o intravenosa son en general de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 75 miligramos por kilogramo de peso corporal al día, más preferentemente de aproximadamente 0,5 miligramos a 5 miligramos por kilogramo de peso corporal al día.

Otras características y ventajas de la invención se proporcionan en la continuación de la descripción con los ejemplos y las figuras cuyas leyendas se representan a continuación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Intensidad de fluorescencia medida después de la aplicación de ATP, o GABA en un ovocito que no expresan los receptores P2X y GABA.

Figura 2: Intensidad de fluorescencia medida después de la aplicación de ATP+GABA, GABA o ATP, en un ovocito que expresa el receptor P2X2.

Figura 3: Intensidad de fluorescencia medida después de la aplicación de ATP+GABA, ATP o GABA, en un ovocito que expresa conjuntamente el receptor GABA-A y el receptor P2X2.

Figura 4: Intensidad de fluorescencia medida después de la aplicación de GABA en diferentes momentos de la respuesta de ATP, en un ovocito que expresa conjuntamente el receptor GABA-A y el receptor P2X2.

Ejemplos

Ejemplo 1: Material y procedimientos

Utilizando un nanoinyector automático, se ha inyectado en el núcleo de ovocitos de *Xenopus* ADNc que codifica receptores P2X2 de rata y/o receptores GABA compuestos por ejemplo de subunidades rat a2 y rat b3 como se describió anteriormente en Boué-Grabot *et al* 2004., (*Journal of Biological Chemistry*, 279: 52517-52525, 2004).

De 1 a 3 días después de la inyección, la sonda fluorescente verde de calcio, que es sensible a la concentración de calcio intracelular libre, se inyectó en ovocitos que expresan P2X2 solos, receptores P2X y GABA o no receptores (no inyectados). A continuación, utilizando vídeo-microscopía (Nikon), se ha registrado la fluorescencia emitida por ovocitos mantenidos en una solución patrón (solución Ringer que contiene cloruro de calcio 1,8 mM), perfundida a razón de 3 ml/min. Se aplicaron las sustancias (ATP 100 mM, GABA 100 µM, ATP + GABA 100 µM de cada uno) diluidas en el mismo tampón utilizando un sistema de aplicación (BPS8-AlaScientific). Se analizaron variaciones en la fluorescencia utilizando el programa informático IpLab.

Ejemplo 2: Ovocitos que expresan no receptores

No se observó ninguna modificación de la fluorescencia en la aplicación de ATP o GABA en un ovocito que no expresa receptores P2X y GABA (figura 1). Estos experimentos confirman que los ovocitos no expresan receptores endógenos que son sensibles a ATP o GABA.

Ejemplo 3: Registro de ovocitos que coexpresan receptores P2X2 solos

La aplicación de ATP produce un aumento temporal de fluorescencia que demuestra el aflujo de calcio a la apertura de los canales del receptor P2X2. El GABA no presentaba ningún efecto sobre la fluorescencia, lo que indica que GABA no activa los receptores P2X2. La aplicación conjunta de ATP+GABA también produce un aumento de fluorescencia similar a la obtenida con ATP solo.

El aumento de fluorescencia producido por la aplicación de ATP en ovocitos que expresan solamente receptores P2X2 no es alterado por GABA (véase la figura 2)

Ejemplo 4: Registro de ovocitos que coexpresan receptores P2X2 y GABA-A

Una aplicación de ATP (100 μ M) produce un aumento temporal notable de fluorescencia de la sonda de calcio, lo que demuestra la activación de los receptores P2X y el ulterior aflujo de calcio (figura 2). Las aplicaciones sucesivas de ATP producen respuestas de amplitud similar. Es importante señalar que este aumento en fluorescencia se observa en el potencial de reposo de la célula.

La aplicación de GABA solo (100 μ M) no modifica la intensidad de fluorescencia. Esto puede explicarse debido a que la activación de los receptores GABA abre una canal de cloruro, que no tiene ningún efecto sobre la concentración de calcio de calcio intracelular.

Si una solución de ATP + GABA (100 μ M de cada uno) se aplican conjuntamente, se obtiene una respuesta del calcio menor que la obtenida ATP solo, demostrando así que la apertura de los canales de GABA inhiben el aflujo de calcio mediado por los receptores P2X.

Esta disminución de la fluorescencia muestra la activación de los receptores GABA-A (figura 3).

El porcentaje de inhibición obtenido (20 a 25% en estos experimentos) es un reflejo de la relación de expresión de los receptores P2X y GABA. Como se ha demostrado utilizando técnicas electrofisiológicas, si la relación de los receptores P2X2 a GABA es 1:1, la inhibición actual por GABA de la respuesta mediada por ATP puede alcanzar entonces el 50%. Se mide por detección por la imagen del calcio, solamente abriendo los canales P2X. Así pues puede suponerse que si los receptores GABA-A interactúan con los receptores P2X2 expresados, la activación de los receptores GABA podría conducir a un cierre de todo el receptor P2X.

Ejemplo 5: Registro de la activación o inhibición de receptores GABA durante la activación de receptores P2X de ovocitos que expresan conjuntamente los receptores P2X2 y GABA-A

La activación o inhibición de receptores GABA puede controlarse también durante la activación de los receptores P2X (véase la figura 4).

Si se aplica GABA en el pico de la respuesta de ATP, se aprecia una disminución en la intensidad de la fluorescencia, lo que demuestra que cuando los receptores GABA están abiertos ello conduce al cierre de los receptores P2X que estaban ya abiertos. Y asimismo, si durante la aplicación conjunta de ATP y GABA, se interrumpe la aplicación de GABA, se observa un aumento en la fluorescencia. Esto indica que el cierre de los receptores GABA eleva la inhibición de algunos de los receptores P2X, es decir permite que se abran los receptores P2X (figura 4).

Esto demuestra que independientemente de la secuencia en la que se aplican los agonistas, la abertura o el cierre de los receptores GABA-A modula directamente la corriente de calcio (medida por la fluorescencia de la sonda sensible al calcio) de los canales P2X producida por el ATP. La medición del aflujo de calcio desde los receptores P2X representa por lo tanto un nuevo procedimiento para realizar el seguimiento de los receptores GABA.

Estos experimentos demuestran la expresión conjunta de los receptores GABA-A α 2, β 3 y P2X2 de rata, pero la presente invención puede utilizarse para detectar todos los receptores GABA-A de rata, ratón o humano utilizando el receptor P2X2 o cualquier otro de los receptores P2X natural o mutado que mantienen la capacidad para interactuar con los receptores GABA.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
 - a) presentar las células que expresan conjuntamente de manera recombinante dicho receptor de canales iónicos y un receptor P2X;
 - b) poner en contacto dichas células recombinantes con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, o en presencia de un agonista de dicho receptor P2X y el agonista de dicho receptor de canales iónicos;
 - c) medir el aflujo de calcio mediante el receptor P2X, y en el que el aflujo de calcio se mide con una sonda de calcio;
 - d) comparar la medida obtenida en la etapa c) con la medida obtenida en las mismas condiciones para un primer control de referencia en el que en la etapa b) el compuesto que va a analizarse no está presente; y
 - e) seleccionar dicho compuesto si la comparación en la etapa d) demuestra un aumento o disminución de manera significativa del aflujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa c) el aflujo de calcio se mide mediante una sonda de calcio fluorescente.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que en la etapa c) el aflujo de calcio se mide mediante una sonda fluorescente de calcio, verde de calcio, Fluo-3 o Fluo-4.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) dichas células recombinantes no expresan endógenamente un receptor que puede ser modulado por dicho agonista de dicho receptor P2X o por el agonista de dicho receptor de canales iónicos.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células recombinantes en la etapa a) son células de mamífero u ovocitos de *Xenopus*.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho receptor P2X es un receptor P2X natural o un receptor P2X mutado que puede interactuar con dicho receptor de canales iónicos.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho receptor P2X se selecciona de entre el grupo constituido por el receptor P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 o P2X7 o cualquier receptor P2X que resulte de la asociación o la combinación de subunidades de receptor P2X que pueden ejercer una función de receptor de canal activado por ATP.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho receptor de canales iónicos o dicho receptor P2X es de origen humano, de rata o de ratón.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho agonista de dicho receptor P2 se selecciona de entre el grupo constituido por ATP, α, β mATP (alfabeta-metileno ATP), benzoilbenzoico ATP (tal como los isómeros 2' y 3' mezclados o 2',3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP (BzATP)) o 2-metiltilio-ATP (2-MeSATP), preferentemente ATP.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto que va a analizarse se analiza por su capacidad para interactuar específicamente con dicho receptor P2X, demostrándose preferentemente dicha interacción específica midiendo si se obtiene un aumento o una disminución significativos del aflujo de calcio en las mismas condiciones para un segundo control de referencia en el que en la etapa a) las células recombinantes utilizadas para dicho segundo control de referencia expresan a dicho receptor P2X y no expresan a dicho receptor de canales iónicos.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho compuesto que va a analizarse no se selecciona si se observa un aumento o una disminución significativos del aflujo de calcio en las células recombinantes para dicho segundo control de referencia.
12. Procedimiento para seleccionar o identificar un agonista de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
 - A) seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de dicho receptor de canales iónicos mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa b) dichas células

recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse solamente en presencia de un agonista de dicho receptor P2X; y

B) selección de dicho compuesto como un agonista si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11 demuestra una disminución significativa del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos para el primer control de referencia.

13. Procedimiento para seleccionar un modulador positivo de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

A) seleccionar o identificar un compuesto que puede modular la actividad de dicho receptor de canales iónicos mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa b) dichas células recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X y el agonista de dicho receptor de canales iónicos; y

B) la selección de dicho compuesto como un modulador positivo si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11 demuestra una disminución significativa del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos en el primer control de referencia.

14. Procedimiento para seleccionar un modulador positivo de un receptor de canales iónicos según la reivindicación 13, en el que en la etapa b) del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11 en A) el agonista de dicho receptor de canales iónicos se utiliza a una concentración no saturada.

15. Procedimiento para seleccionar o identificar un modulador negativo, un inhibidor o un antagonista de un receptor de canales iónicos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

A) seleccionar un compuesto que puede modular la actividad de dicho receptor de canales iónicos mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa b) dichas células recombinantes se ponen en contacto con el compuesto que va a analizarse en presencia de un agonista de dicho receptor P2X, y el agonista de dicho receptor de canales iónicos; y

B) la selección de dicho compuesto como un modulador negativo si la comparación realizada en la etapa d) del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11 demuestra un aumento significativo del flujo de calcio en las células recombinantes en presencia de dicho compuesto en comparación con los resultados obtenidos en el primer control de referencia.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que las mismas células recombinantes utilizadas para analizar un primer compuesto pueden utilizarse para analizar por lo menos un segundo compuesto que ha de analizarse.

17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho receptor de canales iónicos se selecciona de entre el grupo constituido por el receptor GABA, el receptor glicina, el receptor acetilcolina o el receptor serotonina.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho receptor de canales iónicos es el receptor GABA.

19. Procedimiento según las reivindicaciones 17 ó 18, en el que dicho receptor de canales iónicos es un receptor GABA de canales iónicos resultante de la asociación homomérica o heteromérica entre cualquier subunidad del receptor GABA, seleccionándose dicha subunidad de entre el grupo de la subunidad del receptor GABA constituido por 1 a 6 subunidades de alfa, 1 a 3 de beta, 1 a 3 de gamma, 1 a 3 subunidades de delta, épsilon, theta, pi y rho, y formando dicha asociación homomérica o heteromérica un receptor de canales iónicos que puede ser activado por GABA.

20. Procedimiento según las reivindicaciones 18 ó 19, en el que el agonista de dicho receptor de canales iónicos es el GABA o cualquier otro agonista del receptor GABA bien conocido, tal como el muscimol o la isoguvacina.

21. Kit para la selección de un compuesto que puede modular la actividad de un receptor de canales iónicos, en el que dicho kit comprende:

- las células que expresan conjuntamente de manera recombinante un receptor de canales iónicos y un receptor P2X;
- un agonista del receptor P2X seleccionado de entre el grupo constituido por ATP, α,β mATP (alfabeta-metileno ATP), benzoilbenzoico ATP (tal como los isómeros 2' y 3' mezclados o 2',3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP (BzATP)) o

2-metiltio-ATP (2-MeSATP), preferentemente ATP; y

- una sonda de calcio como un marcador para medir el aflujo de calcio en dichas células recombinantes.

5 22. Kit según la reivindicación 21, en el que dicha sonda de calcio es una sonda de calcio fluorescente.

23. Kit según la reivindicación 21 ó 22, en el que dicho kit comprende además un agonista de dicho receptor de canales iónicos.

10 24. Kit según la reivindicación 23, en el que dicho agonista de dicho receptor de canales iónicos es el GABA.

25. Kit según las reivindicaciones 21 a 24, en el que dicho receptor de canales iónicos, el receptor P2X, las células recombinantes y la sonda de calcio se seleccionan independientemente de entre los definidos en las reivindicaciones 1 a 20.

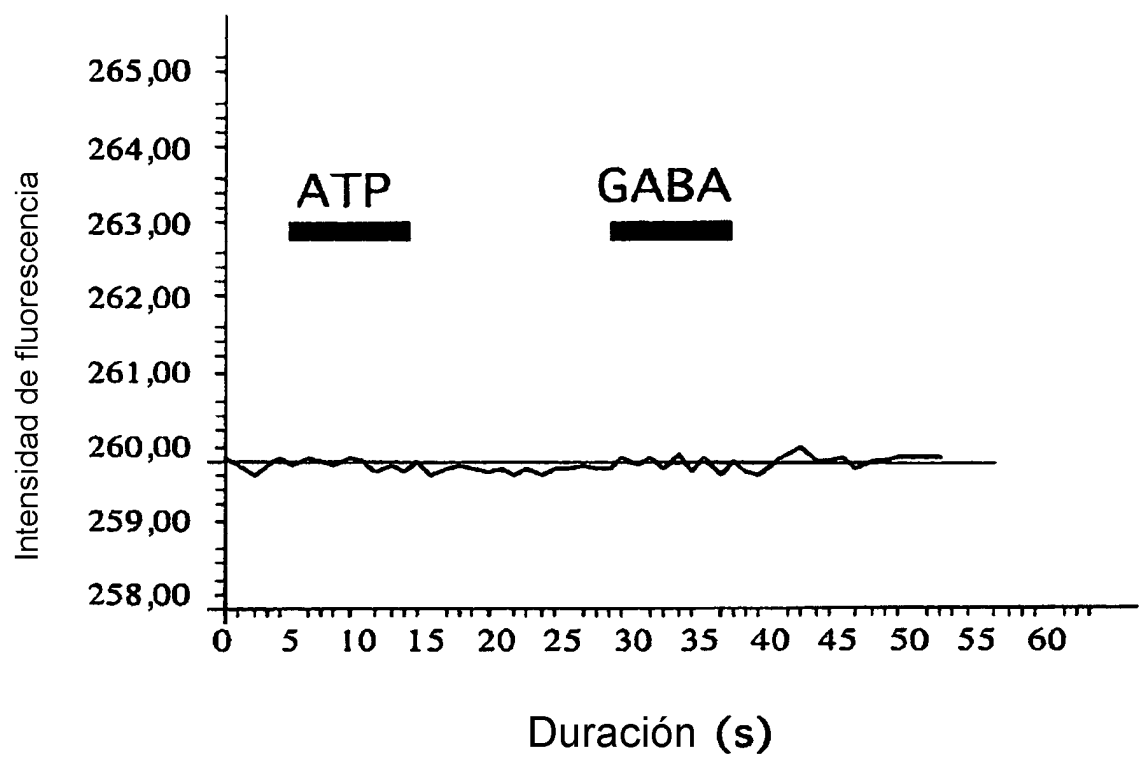


FIGURA 1

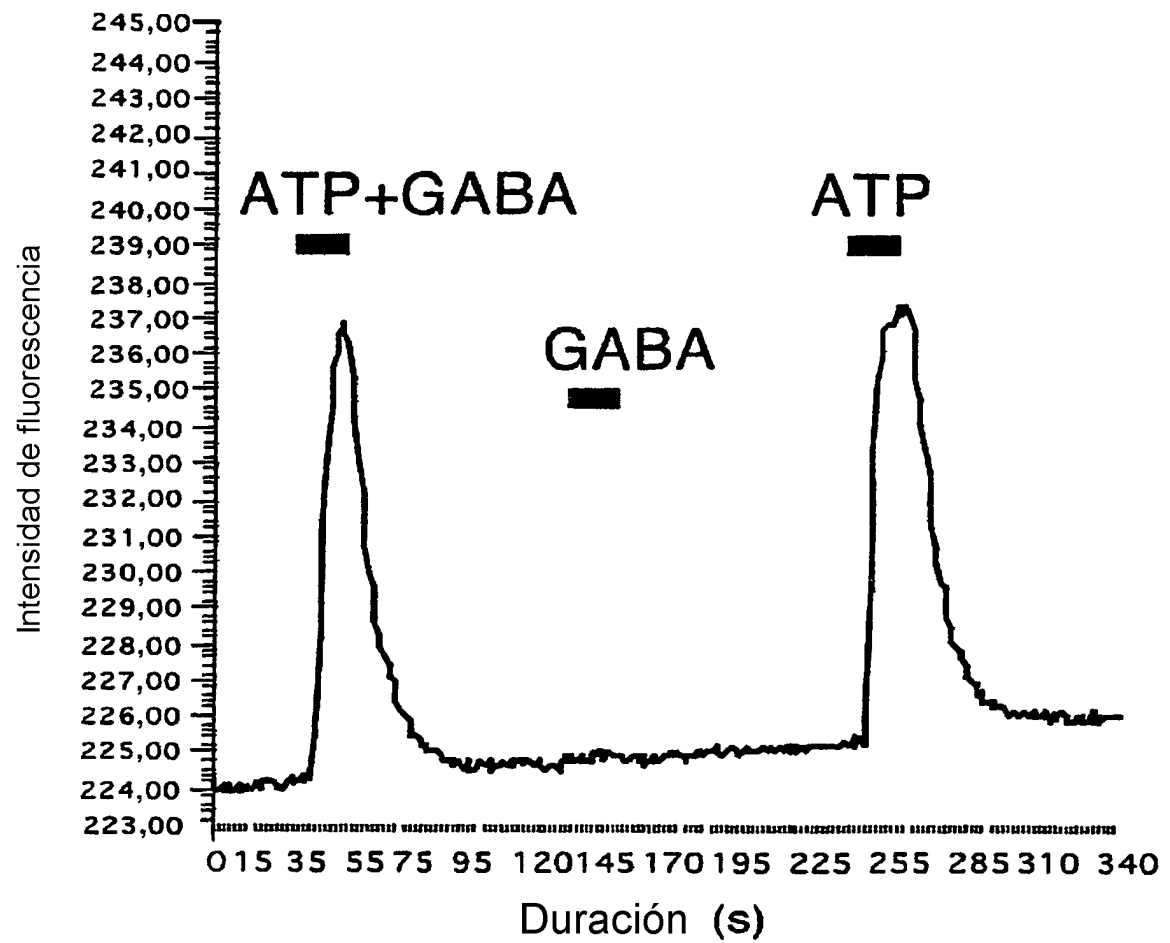


FIGURA 2

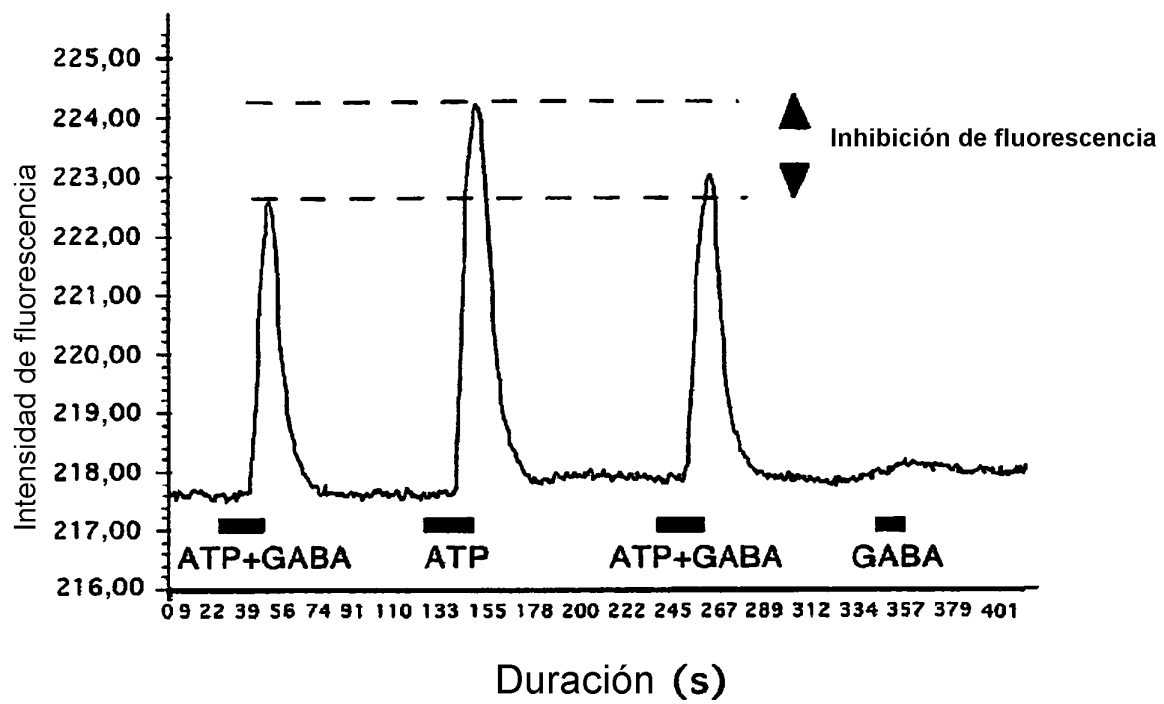


FIGURA 3

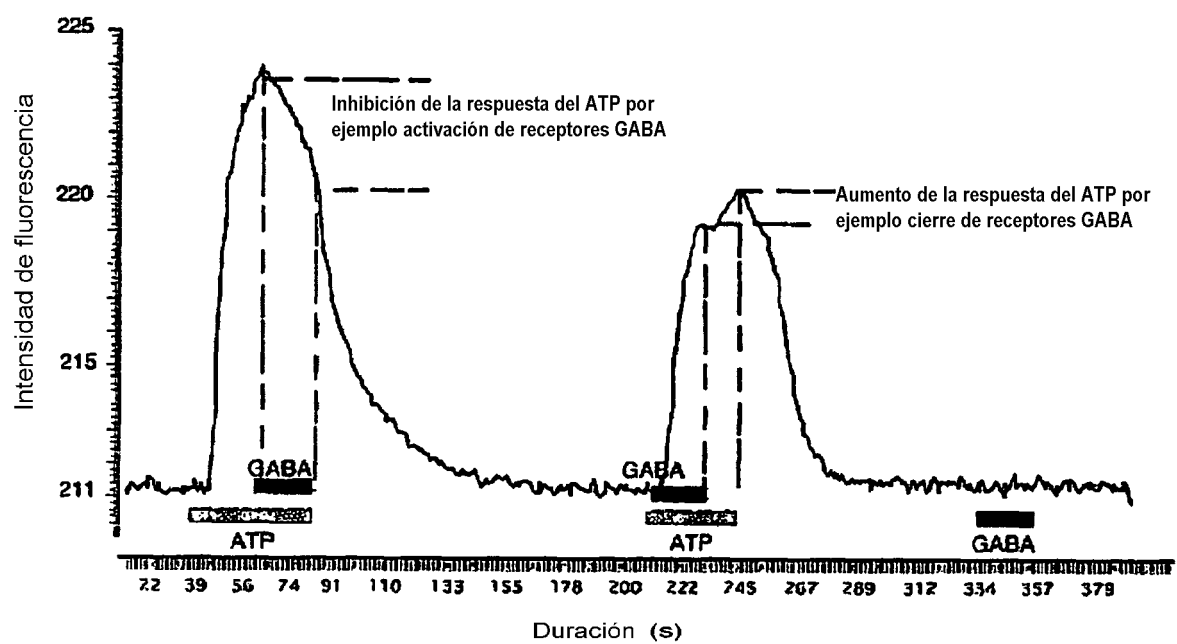


FIGURA 4