

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 939**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008 E 08707734 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2122364**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de la actividad agonista sobre un canal de potasio de un compuesto diana**

30 Prioridad:

13.03.2007 DE 102007012029

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

04.04.2013

73 Titular/es:

**GRÜNENTHAL GMBH (100.0%)
Zieglerstrasse 6
52078 Aachen , DE**

72 Inventor/es:

**STRÜNKER, TIMO;
CAVALAR, MARKUS y
BAHRENBURG, GREGOR**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 399 939 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

Procedimiento para la identificación de la actividad agonista sobre un canal de potasio de un compuesto diana.

La presente invención se refiere a un procedimiento o a un ensayo para la identificación de la actividad agonista de un compuesto diana sobre un canal de iones potasio dependiente de la tensión.

- 5 Los canales iónicos son esenciales para el funcionamiento de las células nerviosas y musculares, al igual que para la mayoría de otras células somáticas. Los canales iónicos participan en prácticamente todos los procesos fisiológicos, por ejemplo en los impulsos eléctricos sobre los que se basan las funciones sensoriales y motoras del cerebro, en el control de la actividad contráctil del corazón, en la musculatura lisa de los vasos óseos e intestinales, así como en la absorción de nutrientes, la secreción hormonal y la secreción y el desarrollo celular.
- 10 Los canales iónicos permiten que los iones atraviesen la bicapa lipídica hidrófoba de la membrana celular, lo que es decisivo para generar y transmitir las señales eléctricas en células vivas. Los canales iónicos pueden clasificarse según su selectividad iónica. Algunos canales iónicos son permeables para cierto tipo de iones bien determinado, por ejemplo para los iones sodio (Na^+), potasio (K^+) o calcio (Ca^{2+}). Por el contrario, otros canales no pueden distinguir o sólo lo hacen en escasa medida los tipos de iones. Éstos se denominan canales iónicos no selectivos. La apertura o el cierre
- 15 de los canales iónicos pueden ser controlados por diferentes mecanismos. Los canales iónicos dependientes de ligandos, por ejemplo, son controlados por el enlace directo de ligandos intra o extracelulares. Los canales iónicos dependientes de la tensión, por el contrario, reaccionan cuando varía el potencial de membrana.

20 El potencial de membrana celular se debe al gradiente eléctrico y al gradiente de concentración de los diferentes iones y partículas cargadas a ambos lados de la membrana celular. Especial importancia tiene aquí la distribución de los iones sodio y potasio en el medio intra y extracelular. La distribución de los iones se basa en la permeabilidad selectiva de la membrana a los diferentes iones y su transporte activo mediante bombas de iones.

25 La actividad de estas "bombas" accionadas por el ATP celular conduce a una distribución desigual de los diferentes iones – especialmente de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- y otros aniones orgánicos – a ambos lados de la membrana celular y, con ello, a gradientes iónicos en la membrana. Así, en estado de reposo se produce un exceso de carga negativa en el lado interior de la membrana en comparación con su lado exterior. Esta separación de cargas resulta en una diferencia de potencial a través de la membrana celular, lo que se denomina potencial de membrana (V_m).

30 En reposo, el potencial de membrana en las neuronas y células musculares oscila en el rango de -60 mV a -80 mV (denominado potencial de membrana en reposo). Las señales eléctricas en las neuronas y células musculares se basan en cambios cortos del potencial de membrana. Estos cambios son provocados por la apertura y cierre transitorios de los canales iónicos, lo que resulta en un flujo de corriente eléctrica a través de la membrana. Si se reduce la separación de cargas en la membrana se habla de despolarización de membrana – el potencial de membrana se vuelve menos negativo. Un aumento de la separación de cargas se denota hiperpolarización, puesto que se produce un potencial de membrana más negativo que el potencial de membrana en estado de reposo.

35 El potencial de membrana en estado de reposo es un llamado potencial de difusión y queda determinado por diferentes factores. Las moléculas sin carga, por ejemplo oxígeno, dióxido de carbono, urea, etc., pueden atravesar libremente la bicapa lipídica hidrófoba de la membrana celular. Por el contrario, los iones, partículas cargadas, sólo pueden atravesar la membrana celular con ayuda de poros selectivos de naturaleza proteica (canales iónicos). Debido a su permeabilidad selectiva para determinadas especies iónicas, la membrana celular es una membrana semipermeable. La actividad de las "bombas" accionadas por el ATP en la membrana celular resulta en una distribución desigual de los diferentes iones

40 – especialmente K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- y aniones orgánicos – a ambos lados de la misma y, por tanto, a gradientes iónicos en la membrana. En la Tabla 1 se muestra la concentración intracelular y extracelular de distintos tipos importantes de iones. La semipermeabilidad de la membrana celular y la desigual distribución iónica a ambos lados de la misma resulta en un potencial de membrana en reposo.

Tabla 1 Concentración de los tipos de iones más importantes dentro y fuera de una célula

Ion	Concentración extracelular (mM)	Concentración intracelular (mM)
Na^+	145	12
K^+	4	155
Ca^{2+}	1,5	0,0001
Cl^-	123	4,2

45

En este contexto y de forma simplificada, se considera que una membrana celular sólo es permeable a un tipo de iones, por ejemplo a los iones potasio (K^+). Los iones K^+ existen en la célula en concentraciones muy altas en comparación con el entorno. Por esta razón, los iones K^+ se difunden, debido al gradiente químico, desde el interior de la célula hacia su

5 exterior. La difusión de K^+ desde la célula, sin embargo, es autolimitativa. El flujo de salida de los iones K^+ de carga positiva y el exceso resultante de aniones impermeables de carga negativa en la célula conducen a que el interior de la célula sea negativo. Debido a esta separación de cargas, se genera una diferencia de potencial eléctrico en la membrana celular. Cuanto más iones K^+ abandonen ahora la célula, tanto mayor será la separación de cargas y tanto mayor resultará la diferencia de potencial, volviéndose el interior de la célula cada vez más negativo. Finalmente, esta diferencia de potencial eléctrico actúa en contra del flujo de salida de los iones K cargados positivamente.

Esto significa que existen dos fuerzas opuestas que afectan a la difusión del potasio a través de la membrana celular: a) el impulso químico dependiente de la diferencia de concentración de potasio y b) el impulso eléctrico determinado por la diferencia de potencial eléctrico en la membrana.

10 Por tanto, la difusión del potasio conduce, después de un corto tiempo, a un potencial de membrana donde el impulso químico, que hace salir los iones K^+ de la célula, es exactamente de la misma magnitud que el impulso eléctrico del potencial de membrana que actúa en contra de la salida de los iones K^+ . En el momento exacto en que se alcanza este potencial de membrana, ya no se produce flujo neto alguno de iones K^+ en la membrana. Este potencial se denomina "potencial de equilibrio del potasio" (E_K).

$$E_K = 61,4 \text{ mV} \times \log \left(\frac{[K^+]_a}{[K^+]_i} \right)$$

Ecuación 1: Ecuación de Nernst para el potasio (a 37°C)

[Ion] = concentración (a) extracelular (i) intracelular

Con ayuda de la ecuación de Nernst se puede calcular el potencial de equilibrio para los iones potasio.

20 Según la ecuación de Nernst (Ecuación 1) el potencial de equilibrio del potasio se calcula dividiendo las concentraciones de potasio a ambos lados de la membrana celular. Si se utilizan las concentraciones de potasio indicadas en la Tabla 1, resulta un potencial de equilibrio para el potasio de -98 mV. Así, el potencial de membrana de una célula, cuya membrana es selectivamente permeable al potasio, correspondería exactamente a E_K y sería de -98 mV.

Tabla 2 Concentración extracelular e intracelular de los tipos de iones más importantes (ver Tabla 1) y su potencial de equilibrio resultante

Ion	Concentración extracelular (mM)	Concentración intracelular (mM)	Potencial de equilibrio (mV)
Na^+	145	12	+67
K^+	4	155	-98
Ca^{2+}	1,5	0,0001	+129
Cl^-	123	4.2	-90

25 Sin embargo, habitualmente en la membrana celular no sólo se encuentran canales iónicos de paso del potasio, sino también canales para otros tipos de iones. Como se muestra en las Tablas 1 y 2, también existe un gradiente de concentración de membrana para estos iones. En consecuencia, también se puede calcular un determinado potencial de equilibrio para estos iones. En la Tabla 2 se muestran los potenciales de equilibrio de los iones más importantes. Por ejemplo, el gradiente para los iones sodio es exactamente contrario al de los iones potasio. El potencial de equilibrio para el sodio, de +67mV, está claramente en el rango positivo.

30 La contribución de los diferentes gradientes iónicos al potencial de membrana en reposo de una célula permeable a los iones potasio, sodio y cloruro se describe mediante la ecuación de voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz (Ecuación 2).

$$V_m = 61,4 \text{ mV} \times \log \frac{P_K [K^+]_a + P_{Na} [Na^+]_a + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_a}$$

Ecuación 2: Ecuación de voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz (37°C)

[ion] = concentración (a) extracelular (i) intracelular. P_x = permeabilidad de la membrana para el ion X; V_m = potencial de membrana

- De la ecuación 2 se observa que el potencial de membrana de una célula viene determinado no sólo por el cociente entre las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana celular, sino, sobre todo, por la permeabilidad (P) de la membrana para el ion correspondiente. Cuanto mayor es la permeabilidad (con frecuencia también llamada conductividad) de la membrana para un determinado ion, tanto mayor es también la contribución de este ion al potencial de membrana. Por ello, el potencial de membrana representa, en cierta medida, la media ponderada del potencial de equilibrio para los diferentes iones.
- La permeabilidad de membrana para el tipo de ión correspondiente se determina únicamente por el número y la actividad de los correspondientes canales iónicos que dejan paso a estos iones. En estado de reposo sólo pocos canales de sodio, cloruro o potasio se encuentran abiertos en la membrana celular. En reposo, el potencial de membrana de la mayoría de las células viene determinado principalmente por la conductividad para el potasio de la membrana ($P_K: P_{Cl}: P_{Na} = 1:0,45:0,04$). Por esta razón, las neuronas y las células musculares tienen un potencial de membrana en reposo de -60 a -80 mV (véase arriba), cerca del potencial de equilibrio del potasio.
- Cuando se modifica la permeabilidad de la membrana a un tipo iónico se produce un cambio del potencial de la membrana celular. Así, por ejemplo, una activación de los canales de sodio desplaza el potencial de membrana en dirección al potencial de equilibrio para el sodio – el potencial de membrana se vuelve más positivo.
- El potencial de membrana también puede adoptar un nuevo valor si se modifica la concentración intracelular o extracelular de un ion (véase la Ecuación 2). La magnitud del cambio del potencial de membrana en este caso depende de la magnitud del potencial de membrana total para dicho ión. Por tanto, normalmente los cambios en la concentración extracelular de sodio, cloruro o potasio tienen sólo una incidencia menor sobre el potencial de membrana. El potencial de membrana, por el contrario, se ve claramente influenciado por la concentración extracelular de potasio.
- El genoma humano contiene aproximadamente 50 diferentes genes de canal de potasio. Los canales de potasio se encuentran prácticamente en cada tipo de célula de un organismo y representan la mayor y más diversificada familia de canales iónicos. La actividad se modula dependiendo del tipo de canal con un estímulo fisiológico diferente, por ejemplo cambios del potencial de membrana (canales dependientes del voltaje), proteínas G, iones potasio, nucleótidos (ATP) etc. En la mayoría de las células, el potencial de membrana en reposo viene determinado por los canales de potasio (véase más arriba). Los canales de potasio inciden en las neuronas y las células musculares de forma decisiva en relación con la frecuencia y el transcurso temporal de los potenciales de acción, así como de su transmisión. Además, regulan la excitabilidad eléctrica de estas células y desempeñan un papel decisivo en algunos procesos de secreción, por ejemplo en la liberación de insulina.
- Los activadores pueden ejercer una influencia sobre la actividad de los canales de potasio de diferentes formas y maneras. Los bloqueadores del canal bloquean los poros del mismo, en la mayoría de los casos, desde el lado intracelular o extracelular de la membrana.
- Por otro lado, por ejemplo, una interacción de un bloqueador del canal con subunidades accesorias puede conducir a que se cierre el poro del canal o no se pueda abrir por un estímulo fisiológico (por ejemplo un bloqueador del canal K_{ATP}).
- Los abridores del canal también pueden conducir a una apertura del poro (por ejemplo el abridor del canal de K_{ATP}) mediante la interacción con subunidades accesorias.
- Sin embargo, la mayoría de los abridores de los canales de potasio que actúan sobre canales dependientes del voltaje, funcionan como “gating modifier” (modificador de puerta). Las sustancias influyen sobre la dependencia del voltaje de la activación de los canales. Debido al enlace de la sustancia, se desplaza la curva de activación de los canales hacia potenciales negativos. Como consecuencia, con el mismo potencial de membrana existen más canales abiertos. La retigabina, un abridor del canal conocido como KCNQ, actúa, por ejemplo, mediante este mecanismo.
- La influencia farmacológica en determinados canales de potasio parece ser de utilidad terapéutica en muchas enfermedades y, en ciertas enfermedades, ya se ha reconocido como una terapia efectiva. Por esta razón, los canales de potasio son “drug targets” (dianas para medicamentos) terapéuticos importantes. Las áreas indicadas son, entre otras, enfermedades neurológicas como epilepsia (por ejemplo canales KCNQ), pero también hipertensión sanguínea (por ejemplo canales K_{ATP} , canales K_{Ca}), arritmias cardíacas (por ejemplo canales K_{ATP} , canales hERG, canales KCNQ, canales HCN), dolor (por ejemplo canales KCNQ), diabetes (por ejemplo canales K_{ATP}), asma, incontinencia (por ejemplo canales K_{ATP}) y otras enfermedades. En la provisión de compuestos que activan o inactivan los canales iónicos, existe, por tanto, un potencial para el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos altamente eficaces.
- En los últimos años ha sido posible identificar una serie de nuevos canales iónicos o subunidades de canales iónicos. Esto ha estimulado el interés en nuevos activadores que modifican la actividad de estos canales.
- La búsqueda de nuevos activadores que influyan sobre los canales de potasio requiere el desarrollo de ensayos que permitan, con el mayor rendimiento posible, comprobar la influencia de las sustancias sobre la actividad del

correspondiente tipo de canal de potasio (Resumen: FORD ET AL., Progress in Drug Research, Vol. 58, p. 133 y ss., 2002).

La publicación US 6.329.367 describe un agonista de los canales de potasio y su utilización con fines terapéuticos.

5 El objetivo de la publicación EP 1760158 es proporcionar un procedimiento para determinar el efecto de las sustancias de ensayo sobre el potencial de membrana de las mitocondrias. Este procedimiento también debe servir para la identificación de abridores de los canales de potasio.

10 La publicación "Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and Their Use in Ion Channel Screening Assays" de Wolff y col., Journal of Biomolecular Screening (Tomo 8, nº 5, 2003, Larchmont, NY, USA) es un estudio comparativo donde se analizaron cuatro sistemas de colorantes diferentes dependientes del potencial de membrana y su interacción con ocho diferentes moduladores de canal con el fin de identificar nuevos canales iónicos.

Actualmente existen diferentes técnicas para medir la actividad de los canales de potasio. La llamada técnica *Patch-Clamp* para la investigación de la actividad de todo tipo de canales iónicos es considerada como el "estándar dorado".

15 Durante mucho tiempo, esta técnica parecía poco adecuada para la exploración de un activador debido a su bajo rendimiento. Para aprovechar la técnica *Patch Clamp* como tecnología HTS (High Throughput Screening [Exploración de alto rendimiento]) se activa intensivamente la automatización de este procedimiento. Con este sistema ya se han desarrollado los primeros ensayos prometedores, por ejemplo para los canales de potasio hERG [*human ether-a-go-go related gene*]. Esta tecnología es prometedora, especialmente para ensayos en los canales de potasio activados por voltaje, como los canales KCNQ. Permite comprobar el efecto de las sustancias sobre los canales bajo condiciones fisiológicas. No obstante, los ensayos celulares no invasivos siguen permitiendo actualmente una búsqueda más rápida de posibles activadores.

20 Los canales de potasio también permiten el paso rubidio (Rb^+) en cierta medida, además del potasio. Los iones rubidio tienen características muy semejantes a los iones potasio, por lo que los canales de potasio apenas diferencian estos dos iones. El Rb^+ no tiene ninguna importancia bajo condiciones fisiológicas, ya que está presente en el cuerpo sólo en trazas. Sin embargo, se ha aprovechado la conductividad de los canales para el rubidio con el fin de desarrollar ensayos no invasivos. Para los canales de potasio, como son los canales dependientes del voltaje KCNQ, hERG, $K_v1.3$ y canales K_{ATP} , se desarrollaron ensayos clásicos de flujo de Rb^+ en formato de placas de microtitulación (por ejemplo SCOTT ET AL., Analytical Biochemistry, 319 (2003), 251-257). Para ello, las células que expresen el canal correspondiente se cargan primero con rubidio radiactivo. A continuación por ejemplo se mide el efluente de rubidio radiactivo de las células de cultivo después de una activación precisa del correspondiente canal de potasio. Mientras tanto también es posible utilizar en estos ensayos rubidio no radiactivo. El efluente de rubidio se observa entonces con ayuda de espectroscopía de absorción atómica. El esfuerzo experimental y el coste de tales ensayos, sin embargo, son muy altos, por lo que hasta la fecha este procedimiento no se ha generalizado. Tanto la técnica *Patch-Clamp* como también los ensayos de flujo de rubidio son adecuados en principio para buscar abridores y bloqueadores de los canales de potasio.

35 Sin embargo, las tecnologías más difundidas son aquellas de ensayo basadas en células con las que se explora ópticamente el efecto de las sustancias sobre los canales de potasio con ayuda de colorantes fluorescentes especiales (por ejemplo WHITEAKER ET AL., Journal of Biomolecular Screening, vol. 6, nº 5, 2001). Aquí se utilizan los llamados colorantes fluorescentes sensibles al voltaje. Estos colorantes provocan en la célula y en la membrana celular una fluorescencia intensa, mientras que en la fase acuosa extracelular son sólo débilmente fluorescentes. Un cambio en el potencial de membrana conduce, con estos colorantes, a un cambio en la distribución de las moléculas colorantes entre la fase extracelular, la membrana celular y el interior de la célula. Por tanto, un cambio del potencial de membrana resulta en un cambio de la intensidad de fluorescencia. Una despolarización del potencial de membrana conduce a un aumento de la intensidad de fluorescencia, mientras que ésta se reduce cuando la célula se hiperpolariza. El cambio absoluto en la intensidad de fluorescencia puede ser aquí de aproximadamente el 1-2,5% por 1 mV de modificación del potencial de membrana, según el colorante y el sistema celular.

45 A continuación se explica cómo se pueden buscar activadores con ayuda de colorantes fluorescentes sensibles al voltaje, activadores que inciden sobre la actividad de los canales de potasio.

50 Ensayos "directos" del potencial de membrana para la búsqueda de moduladores del canal de potasio: con este tipo de ensayo se pueden identificar tanto bloqueadores del canal de potasio (ensayo de despolarización) como también abridores del canal de potasio (ensayo de hiperpolarización). Para ello, la influencia de los activadores sobre el potencial de membrana, expresando el correspondiente canal de potasio, se observa directamente. En primer lugar se incuban las células con el colorante fluorescente y a continuación se registra la intensidad de fluorescencia de las células antes y después de aplicar el activador.

55 La Figura 1 muestra un ejemplo de curva temporal de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan los canales KCNQ antes y después de la aplicación de una concentración saturadora de XE991, un bloqueador de canal de KCNQ conocido. Después de aplicar el bloqueador de canal de KCNQ, se puede observar un aumento en la intensidad de fluorescencia de aproximadamente un 55%. Bloqueando los canales de KCNQ por XE991 se reduce la permeabilidad de la membrana para los iones potasio. Según la Ecuación 2 arriba indicada, se reduce así la influencia

del potencial de equilibrio del potasio sobre el potencial de membrana celular, generándose un nuevo potencial de membrana más positivo. Esta despolarización resulta en un aumento de la intensidad de fluorescencia en las células.

Según el tipo de canal de potasio y el sistema celular, con estos “ensayos de despolarización” se puede observar un aumento de la intensidad de fluorescencia del 100 % y superior mediante la aplicación de un bloqueador del canal de potasio. En el caso de los canales de potasio dependientes del voltaje, como los canales KCNQ, los cambios de fluorescencia o del potencial de membrana, sin embargo, son más bien menores.

Los activadores que abren los canales de potasio en la membrana celular (o desplazan su dependencia del voltaje de la activación hacia potenciales más negativos; los llamados “modificadores de puerta” [*gating modifier*]) resultan también en una dependencia del potencial de membrana. La Figura 2 muestra, a modo de ejemplo, la curva temporal de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan canales de KCNQ, antes y después de la aplicación de retigabina, un abridor del canal de KCNQ conocido (o bien un “*gating modifier*”). La aplicación de retigabina conduce a una reducción de la intensidad de fluorescencia de aproximadamente un 35 al 40%. La apertura de los canales de KCNQ por la retigabina aumenta la permeabilidad de la membrana al potasio. Según la Ecuación 2 anterior, se aumenta así la influencia del potencial de equilibrio del potasio sobre el potencial de membrana celular, generándose un nuevo potencial de membrana más negativo. Esta hiperpolarización resulta en una reducción de la intensidad de fluorescencia en las células.

Sin embargo, el rango dinámico de estos ensayos de hiperpolarización para la búsqueda de facilitadores de los canales de potasio (por ejemplo “*gate modifier*”) en la mayoría de los casos no es mayor del 50% y, por tanto, es más bien pequeño. La razón principal es que la magnitud de la hiperpolarización que puede ser provocada por los facilitadores de canales de potasio está limitada. El potencial de membrana puede adoptar, como máximo, el valor del potencial de equilibrio del potasio, por lo que la magnitud de la hiperpolarización queda limitada, en la mayoría de los casos, a 20-30 mV.

Además del rango dinámico reducido, tanto los ensayos de despolarización para bloqueadores del canal de potasio como también los ensayos de hiperpolarización para los abridores de los canales de potasio (o “*gating modifiers*”) tienen otras desventajas: los colorantes fluorescentes utilizados tienen tendencia a interactuar con las sustancias de ensayo. A menudo, el resultado son cambios de fluorescencia no específicos de los colorantes de hasta un 20% y más. Con frecuencia, estos cambios no específicos en la fluorescencia difícilmente se distinguen de las señales específicas del canal, lo que puede conducir a múltiples resultados negativos y positivos erróneos con una exploración de alto rendimiento.

Por tanto, para buscar bloqueadores de los canales de potasio se utiliza principalmente un procedimiento de ensayo “indirecto”, los llamados ensayos “*ion jump*” (*salto iónico*).

En este tipo de ensayos del potencial de membrana, que hasta ahora se han utilizado exclusivamente para la búsqueda de bloqueadores de los canales de potasio, se determina indirectamente el efecto de las sustancias sobre los correspondientes canales de potasio. Así, las células que expresan el correspondiente canal de potasio se incuban primero con un colorante fluorescente sensible al voltaje. En un segundo paso se aplican los activadores. A continuación se observa la intensidad de fluorescencia de las células antes y después de la aplicación de los iones potasio al medio extracelular. La concentración extracelular de los iones potasio aumenta desde 1-5 mM a 50-100 mM con la aplicación de K^+ .

El aumento de la concentración extracelular de potasio conduce a que el potencial de equilibrio para el potasio sea más positivo (Ecuación 1). Debido a que el potencial de membrana de las células también viene determinado por el potencial de equilibrio para el potasio, las células se despolarizan debido a la aplicación de K^+ . La magnitud de la despolarización, sin embargo, depende del alcance de la permeabilidad de la membrana para el potasio (Ecuación 2), cuanto menor es la permeabilidad para el potasio tanto menor es la despolarización y tanto menor es el cambio de fluorescencia en las células debido a la aplicación del K^+ . La permeabilidad de la membrana para el potasio se reduce cuando se bloquean los canales de potasio. Por tanto, en presencia de un bloqueador, el aumento de la fluorescencia en las células después de la aplicación de K^+ es menor si se compara con el aumento de fluorescencia en ausencia del mismo.

La Figura 3 ilustra un ejemplo de reacción de fluorescencia en células que expresan los canales KCNQ frente a la inyección de potasio al medio extracelular en ausencia y presencia de un bloqueador del canal KCNQ. En ausencia de bloqueador del canal KCNQ (células control) de la aplicación de potasio resulta un aumento de la intensidad de fluorescencia de aproximadamente un 80%. Por el contrario, se puede observar que no hay aumento de la fluorescencia después de la aplicación de potasio en presencia de una concentración de saturación del bloqueador de los canales KCNQ conocido como XE991. La diferencia de amplitud de las reacciones de fluorescencia en ausencia y presencia de un bloqueador del canal KCNQ, esto es el rango dinámico del ensayo, en este caso es de aproximadamente un 80%.

En un ensayo “*ion jump*” de este tipo, las amplitudes del cambio de fluorescencia inducido por K^+ pueden diferenciarse en presencia y ausencia del bloqueador en hasta un 300%, según el tipo de canal de potasio y el sistema celular. Debido a este rango dinámico principalmente amplio de las grandes señales de fluorescencia y de la buena reproducibilidad, los ensayos “*ion jump*” se utilizan desde hace años de forma generalizada para buscar bloqueadores de los canales de potasio (por ejemplo FALCONER ET AL., Journal of Biomolecular Screening, Vol. 7, nº 5, 2002,

WOLFF ET AL., Journal of Biomolecular Screening 8(5) 2003). Hasta la fecha no se han utilizado para la búsqueda de abridores de los canales de potasio. Tampoco se conocía hasta la fecha el efecto de los abridores de los canales de potasio en estos ensayos “*ion jump*”.

5 En referencia a los ensayos “*ion jump*” arriba descritos, se trata de ensayos robustos y bien establecidos para encontrar bloqueadores de los canales de potasio, es decir compuestos que bloquean o cierran los canales de potasio.

10 Por el contrario, sólo existen ensayos de hiperpolarización, en la mayoría de los casos poco satisfactorios y no fiables, para buscar compuestos que abran los canales de iones, en particular los canales de potasio (los denominados abridores de canal o agonistas o también “*gating modifier*”). En contraposición a los ensayos de bloqueadores “*ion jump*” robustos y establecidos arriba descritos, los ensayos de potencial de membrana conocidos hasta la fecha para buscar abridores de canal, particularmente para los canales de potasio dependientes del voltaje, como son los canales KCNQ, están claramente limitados. Habitualmente el rango dinámico, la fiabilidad y la reproducibilidad son reducidos. Para buscar abridores de canal se utilizan hasta la fecha exclusivamente ensayos de hiperpolarización (por ejemplo WHITEAKER ET AL., Journal of Biomolecular Screening, Vol. 6, nº 5, 2001; GOPALAKRISHNAN ET AL., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 303, nº 1 (2002), pág. 379-386 y British Journal of Pharmacology (2004) 143, 81-90).

15 Estos ensayos sólo proporcionan, sobre todo en el caso de los canales de potasio dependientes del voltaje, ventanas de medida muy pequeñas (rango dinámico pequeño). La ventana de medida pequeña depende de las características biofísicas de los canales: las células de cultivo, por ejemplo células CHO ó HEK, habitualmente tienen un potencial de membrana de aproximadamente -20 a -40 mV, lejos del potencial de equilibrio del potasio. La razón es que estas células apenas expresan las conductividades propias del potasio. El potencial de membrana de estas células, por tanto, apenas se ve influenciado por el potencial de equilibrio del potasio.

20 Con la expresión heteróloga de un canal de potasio dependiente del voltaje se modifica el potencial de membrana de las células en cultivo. La actividad basal de los canales dependientes del voltaje resulta en un desplazamiento del potencial de membrana en dirección del potencial de equilibrio del potasio – el potencial de membrana se vuelve más negativo. Sin embargo, esta hiperpolarización es autolimitadora, puesto que los canales se cierran de nuevo por la hiperpolarización. Por tanto, se produce un nuevo estado de equilibrio. En el caso de las células CHO y HEK, la expresión de un canal de potasio dependiente del voltaje resulta en un potencial de membrana de aproximadamente -60 a -70 mV.

25 Si ahora se activan los canales mediante un abridor del canal de potasio, el potencial de membrana se desplaza aún más en dirección del potencial de equilibrio del potasio, aproximadamente -90 mV. El potencial de membrana puede no llegar a ser aquí más negativo que el potencial de equilibrio del potasio. Puesto que las células ya tienen un potencial de membrana de aproximadamente -60 a -70 mV debido a la actividad basal de los canales de potasio, la amplitud de la hiperpolarización inducida por los abridores de canal queda limitada en 20 a 30 mV.

30 Puesto que en los ensayos de hiperpolarización utilizados hasta la fecha para los canales de potasio dependientes del voltaje se observa exactamente esta hiperpolarización inducida por los abridores del canal de manera directa con ayuda de colorantes fluorescentes sensibles al voltaje, la amplitud de la reacción de fluorescencia también queda limitada correspondientemente. El rango dinámico de los ensayos de hiperpolarización utilizados hasta la fecha para los canales de potasio dependientes del voltaje es, por tanto, reducido, lo que hasta ahora ha dificultado un análisis fiable efecto-estructura.

35 En los canales no dependientes del voltaje, por ejemplo los canales K_{ATP} o también algunos canales de potasio activados por calcio, el rango dinámico de los ensayos de hiperpolarización en la mayoría de los casos es algo mayor, ya que estos canales tienen una actividad basal reducida en ausencia de un abridor de canales y, por ello, el potencial de membrana de las células es más positivo en ausencia de dicho abridor.

40 El pequeño rango dinámico de los ensayos de hiperpolarización para los abridores del canal de potasio y también las frecuentes interacciones no específicas colorante-abridor pueden impedir el análisis fiable estructura-efecto de los abridores o conducir a resultados poco satisfactorios. Por tanto, existe la necesidad de ensayos para abridores de los canales de potasio, en particular dependientes del voltaje.

45 Por tanto, el objeto de la invención es proporcionar un procedimiento con el que se puedan encontrar de modo sencillo y fiable abridores de los canales de potasio. El procedimiento debe ser rápido, eficiente y altamente sensible y ha de ser universalmente adecuado para el ensayo de cualquier canal de potasio dependiente del voltaje en estos compuestos de apertura. Por otro lado, el procedimiento debe ser adecuado para ensayar la capacidad de cualquier compuesto para abrir un canal de potasio dependiente del voltaje. Además, el procedimiento debe tener un ratio de acierto falso positivo bajo, llegar a pocos resultados falsos-negativos y destacarse por su alta reproducibilidad. Por otro lado, el procedimiento también debe ser adecuado tanto para su utilización a nivel de laboratorio como en una exploración de alto rendimiento (high throughput Screening, HTS) y para la automatización. El procedimiento ha de ser, además, barato, no constituyendo una carga innecesaria al entorno, por ejemplo debido a productos químicos radiactivos o tóxicos. Preferentemente, el procedimiento es adecuado para la búsqueda de abridores de los canales de potasio dependientes del voltaje.

Sorprendentemente se ha descubierto ahora que el principio de medida de los ensayos "ion jump" se puede aplicar con éxito, siendo altamente sensible, para la identificación de compuestos que abren los canales de potasio o "gating modifiers" que influyen sobre la dependencia del voltaje de los canales de potasio activados por voltaje. Un "gating modifier" actúa como abridor del canal de potasio si la dependencia del voltaje de los canales de potasio o el voltaje de activación semimáximo se desplaza hacia potenciales más negativos. Además, se ha descubierto que, con una modificación del principio de medida "ion jump", se puede establecer un nuevo ensayo con el que averiguar de modo sencillo y efectivo la actividad de un compuesto diana, la actividad agonista, es decir si abre o modifica la dependencia del voltaje de la activación, sobre un canal de potasio. Se ha descubierto que este formato de ensayo de alta sensibilidad es adecuado para la identificación y caracterización precisas de abridores de los canales de potasio. Además se ha descubierto que el principio de medida de los ensayos "ion jump" es especialmente apropiado para identificar compuestos que abren los canales de potasio dependientes del voltaje.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar la actividad agonista de un compuesto diana sobre un canal de potasio dependiente del voltaje, caracterizado porque a) se prepara una población de células que expresan un canal de potasio, b) se incuban las células de a) con un colorante fluorescente sensible al voltaje, c) se añade el compuesto diana a la mezcla de reacción b), d) se determina un valor F_1 de la intensidad de fluorescencia de las células, e) se añaden los iones potasio en una concentración fisiológicamente compatible, f) se determina un valor F_2 de la intensidad de fluorescencia de las células y g) se compara la intensidad de fluorescencia F_2 con la intensidad de fluorescencia F_1 , calculándose así la actividad agonista del compuesto diana sobre el canal de potasio. Para ello, preferentemente el cálculo se realiza con F_2 y F_1 de la forma siguiente:

$$\left(\frac{F_2 - F_1}{F_1} \right) \times 100 = \frac{\Delta F}{F} (\%)$$

Para averiguar si una sustancia tiene actividad agonista se puede comparar, por ejemplo $\Delta F/F$ con el $(\Delta F/F)_k$ de las células control. El $(\Delta F/F)_k$ se averigua a) incubando con un colorante fluorescente una población de células que expresan el canal de potasio, b) añadiendo a la mezcla de reacción de a), en lugar de un compuesto diana, únicamente una solución tampón, c) determinando un valor F_{1K} de la intensidad de fluorescencia de las células de control, d) añadiendo iones potasio en una concentración fisiológicamente compatible, e) determinando un valor F_{2K} de la intensidad de fluorescencia de las células control y f) realizando el cálculo con F_{2K} y F_{1K} , preferentemente como sigue:

$$\left(\frac{F_{2K} - F_{1K}}{F_{1K}} \right) \times 100 = \left(\frac{\Delta F}{F} \right)_K (\%)$$

Una sustancia tiene actividad agonista sobre el canal de potasio si $\Delta F/F$ es mayor que $(\Delta F/F)_k$, esto es

$$\frac{\Delta F}{F} > \left(\frac{\Delta F}{F} \right)_K$$

Independiente de la comparación de $\Delta F/F$ con $(\Delta F/F)_k$, también se puede deducir la actividad agonista de un compuesto diana si se observa un aumento de $\Delta F/F$ a medida que aumenta la dosificación del compuesto diana.

La actividad agonista de un compuesto diana sobre un canal de potasio debe entenderse como cualquier actividad del compuesto diana que abra este canal. Se trata de una actividad de apertura cuando la dependencia del voltaje de los canales o el voltaje semimáximo de activación se desplaza hacia potenciales más negativos. Este concepto engloba, por lo tanto, también a los llamados "gating modifiers". Con el procedimiento según la invención se puede averiguar todo tipo de compuestos que abren un canal de potasio, independientemente de si estos lo abren por completo o sólo en determina medida.

Lo sorprendente es que este principio de ensayo, desconocido hasta la fecha para los abridores de canales iónicos y, particularmente de los canales de potasio, supera ampliamente los ensayos conocidos de hiperpolarización. El rango dinámico de este novedoso ensayo "ion jump" alcanza, para los canales KCNQ, aproximadamente un 250%, siendo por tanto más de seis veces el rango dinámico de un ensayo de hiperpolarización, que para los canales KCNQ es sólo de aproximadamente un 35-40%.

Este ensayo innovador para abridores de los canales de potasio es extremadamente fiable, reproducible y permite un análisis fiable estructura-efecto. Así, el formato de ensayo según la invención para los abridores de los canales de potasio supera a los formatos de ensayo de hiperpolarización utilizados hasta la fecha.

- Además, el ensayo según la invención tiene la ventaja de que con el principio de salto iónico no se observa la hiperpolarización limitada inducida por el abridor de canales. En los ensayos de salto iónico se determina más bien la actividad de los canales de potasio de modo indirecto a través de la dependencia potásica del potencial de membrana del potasio. Las limitaciones de los ensayos de hiperpolarización utilizados hasta la fecha no son aplicables en este caso. Por esta razón, el rango dinámico del nuevo formato de ensayo de salto iónico es mucho mayor que el de los ensayos tradicionales, lo que permite una búsqueda más fiable y sensible de activadores, en particular abridores de los canales de potasio sensibles al voltaje. Así, el ensayo de nuevo desarrollo supera los formatos de ensayo utilizados hasta la fecha, en particular en cuanto a la búsqueda de abridores para los canales de potasio dependientes del voltaje.
- El amplio rango dinámico del nuevo procedimiento de ensayo permite, además, identificación particularmente abridores de los canales de potasio sensibles al voltaje que sólo tienen un efecto agonista débil sobre los correspondientes canales. Con los ensayos de hiperpolarización utilizados hasta la fecha, tales activadores se identifican escasamente, puesto que el rango dinámico de estos ensayos es muy reducido.
- Debido a que en el procedimiento de ensayo de la invención para la búsqueda de abridores de los canales de potasio se selecciona, además, indirectamente, con ayuda de la despolarización inducida por potasio, el efecto de las sustancias sobre los canales de potasio dependientes del voltaje, se pueden desprestigiar las interacciones no específicas colorante-activador, pudiendo aprovecharse básicamente el principio y las ventajas de los colorantes sensibles al voltaje. Así la presencia de resultados falsos-positivos y falsos-negativos se reduce en comparación con los ensayos tradicionales de hiperpolarización, consiguiéndose una mayor sensibilidad del formato de ensayo según la invención.
- En el procedimiento según la invención se utilizan pasos de procedimiento ya conocidos de los ensayos de salto iónico. Preferentemente se realizan las modificaciones del ensayo de salto iónico indicadas a continuación para mejorar o aumentar la capacidad y la sensibilidad del procedimiento según la invención para identificar compuestos que abren un canal de potasio dependiente del voltaje.
- De acuerdo con la invención, en primer lugar se incuban una población de células que expresan el canal de potasio dependiente del voltaje con un colorante fluorescente sensible al voltaje. Se puede utilizar cualquier población de células, siempre que expresen el canal iónico correspondiente a ensayar. Tales líneas celulares son bien conocidas por el especialista. Como ejemplos se pueden citar líneas celulares transitorias transfectadas, líneas celulares estables, cultivos celulares primarios y células tisulares, al igual que líneas celulares que expresan un canal de potasio de modo endógeno. Ejemplos de éstas últimas son las células F-11 ó PC-12, que expresan canales endógenos KCNQ.
- El cultivo de las células se lleva a cabo de modo bien conocido y en medios de cultivo conocidos. El cultivo se realiza según el método conocido en el sector especializado para las células que expresan el correspondiente canal de potasio. Por ejemplo, se cultivan las células de CHO que expresan los canales KCNQ (células ováricas de hámster chino) en botellas rodantes como cultivo en suspensión o como adherente en placas Petri, preferentemente en matraces de cultivo. Preferentemente como medio nutritivo se utiliza un Medio Esencial Mínimo (MEM) en una mezcla de suero fetal de ternera. De preferencia las células se cultivan en un Medio Mínimo Esencial (MEM) α Medium 22571 1x líquido (Invitrogen) con un 10% de suero fetal de ternera (Gibco, inactivado por calor) a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad del aire. Para el paso, se desprenden las células de forma mecánica o enzimática, preferentemente enzimática con tripsina, con especial preferencia de modo enzimático con Acutasa (firma PAA). La transformación de las células se produce a un ritmo tal que al sembrar sobre placas de medición se alcanza aproximadamente un 70% de confluencia o, preferentemente, después de un régimen fijo, de división.
- A continuación se siembran las células sobre placas de medición. Para la cosecha de las células desde las botellas de cultivo, éstas se lavan con un tampón adecuado y se separan de modo mecánico o enzimático del material de soporte. Preferentemente se utiliza un método enzimático/químico con tripsina y ácido etilendiaminacético (EDTA). Especialmente adecuado es el método de lavar las células en confluencia con un tampón 0,8-2 mM CaCl₂, 1-5 mM de KCl, 1-2 mM KH₂PO₄, 0,2-1 mM MgCl₂, 100-200 mM NaCl, 5-10 mM Na₂HPO₄, 0-10 mM D-glucosa y 0-0,5 mM de un tampón de piruvato sódico, e incubar las células con una concentración baja de tripsina para la disolución durante 2 a 15 minutos, a 37°C. Especialmente adecuado es lavar las células en una confluencia del 80% con un tampón 0,9 mM CaCl₂, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl y 8 mM Na₂HPO₄ e incubar las células para la disolución con 2 ml de acutasa (PAA) durante 15 minutos, a 37°C.
- Las células separadas se resuspenden en una cantidad apropiada de nutriente, preferentemente entre 5 y 10 ml. La determinación del número de células se lleva a cabo en una cámara de conteo o en un contador celular, preferentemente en un contador celular CASY (sistema Schärfe). La siembra se realiza en placas de medición de 384 ó 96 pocillos adecuadas para la medición de fluorescencia, preferentemente sobre placas donde el material sintético permite una mejor adherencia de las células o que presentan un revestimiento especial para ello. De preferencia se utilizan placas de 96 pocillos con un recubrimiento de poli-D-lisina, de poli-L-lisina, de colágeno o de fibronectina. Especial preferencia tienen las placas de 96 pocillos de Coming® CellBIND® (negras con fondo claro). Se siembran entre 10.000 y 40.000 células por pocillo en las placas de 96 pocillos. De preferencia se siembran de 15.000 a 25.000 células por pocillo. Con particular preferencia, se siembran 20.000 células en 100 μ l de medio nutriente y se incuban durante 16-32h a 37°C, con un 5% CO₂ y un 95% de humedad del aire. Es especialmente ventajoso incubar las células durante 1h a temperatura ambiente antes de la incubación a 37°C para asegurar su adherencia uniforme.

Para las células que expresan otros canales de potasio pueden ser apropiados otros protocolos de cultivo celular que son conocidos por el técnico especialista.

5 Alternativamente, también se pueden utilizar células que expresan tanto un canal de potasio como también un sensor de voltaje óptico fluorescente basado en proteínas. Tales células son bien conocidas por el técnico especialista y tienen la ventaja de que se puede suprimir el paso de incubación con un colorante fluorescente sensible al voltaje. La preparación de estas células para el procedimiento según la invención puede realizarse, por ejemplo, con ayuda del protocolo arriba descrito para las células que expresan un canal de potasio.

A continuación se incuban o cargan las células, si es el caso, con un colorante fluorescente sensible al voltaje.

10 Para la incubación de las células se pueden utilizar diferentes colorantes fluorescentes sensibles al voltaje. Tales colorantes son bien conocidos por el técnico del sector y se citan a continuación a modo de ejemplo.

En principio, los colorantes fluorescentes sensibles al voltaje se pueden dividir en dos clases: colorantes “lentos” y “rápidos”. Entre los colorantes “lentos” sensibles al voltaje se cuentan, por ejemplo, colorantes de carga positiva basados en cianina o carbocianina o rodamina, o también colorantes aniónicos de oxonol, de bisoxonol o colorantes de merocianina (por ejemplo el kit de potencial de membrana DIS-BAC₂(3), DiBAC₄(3), DiOC₂(3); DiC₃(3). En cuanto al kit de producto del potencial de membrana, se trata de un producto comercial de la firma Molecular Devices Corporation. Este kit se ofrece actualmente en dos variantes.

Variante azul: Membrane Potential Assay Kit Blue

Variante roja: Membrane Potential Assay Kit Red

20 En la literatura, a este kit se le conoce también como “FLIPR Membrane Potential Dye”. Ambas variantes del kit son adecuadas para llevar a cabo el procedimiento de ensayo según la invención.

Estos colorantes muestran una fluorescencia intensa en la célula y la membrana celular, mientras que en la fase extracelular acuosa tienen una fluorescencia muy débil. Con estos colorantes de Nernst, un cambio del voltaje de membrana (V_m) conduce a un cambio en la distribución de las moléculas del colorante entre la fase extracelular, la membrana celular y el interior de la célula. Con ello se puede observar un cambio en la intensidad de fluorescencia de la célula en función del voltaje. Puesto que el proceso de cambio de distribución es relativamente lento, las constantes temporales para los cambios de la intensidad de fluorescencia son, según el colorante, de aproximadamente 1-20 segundos. El cambio absoluto de la intensidad de fluorescencia es, con este grupo de colorantes, de aproximadamente un 1-2,5 % por mV de cambio en el potencial de membrana.

30 Al tipo de colorantes “rápidos” sensibles al voltaje pertenecen, por ejemplo, los colorantes estirilo y también algunos oxonoles (por ejemplo di-8-ANEPPS, di-4-ANEPPS, RH-421, RH-237, etc.) y también hemicianinas (por ejemplo Aninne-3 y Aninne-6). Esas moléculas anfipáticas prácticamente no emiten fluorescencia en solución acuosa. Sin embargo, se acumulan en la membrana celular y muestran allí una fuerte fluorescencia. Un cambio de V_m conduce, en los colorantes electrocromicos (por ejemplo colorantes estirilo), a un cambio en la distribución electrónica en la molécula del colorante (llamado cambio “stark shift”). Así, se desplaza el espectro fluorescente de los colorantes. Otros colorantes “rápidos” (por ejemplo algunos oxonoles) modifican su posición en la membrana en función del voltaje, lo que también resulta en un cambio de las características espectrales. Las constantes temporales para este proceso son inferiores a un milisegundo. El desplazamiento del espectro en función del voltaje es muy pequeño. Por esta razón, incluso con una selección óptima del filtro, sólo se puede detectar un cambio pequeño (aprox. 0,1% por 1 mV) de la intensidad de fluorescencia.

40 Para los ensayos HTS, además, también son interesantes según la invención combinaciones innovadoras de colorantes donde, en función del voltaje, se produce una transferencia de Förster de energía de resonancia. Desde hace algún tiempo se pueden obtener de las compañías Invitrogen y Axion tales sistemas colorantes para detectar el potencial de membrana. Puesto que estos sistemas FRET se basan en colorantes “lentos”, la sensibilidad oscila en el orden de magnitud de la de los colorantes lentos.

45 Además de los colorantes aquí descritos, también existen ejemplos para sensores de voltaje basados en proteínas, por ejemplo las llamadas proteínas Flash, Flare, SPARC y VSFP-1. Tales “sondas sensibles al voltaje de proteínas fluorescentes” (sensores de voltaje FP) podrían sustituir en el futuro a los colorantes utilizados hasta la fecha. En principio, estos sensores de voltaje son adecuados para el procedimiento según la invención. Estos sensores de voltaje ópticos fluorescentes basados en proteínas también son expresados por la célula, que también expresa el canal de potasio.

50 Especialmente adecuados para el sistema de ensayo según la invención son los colorantes del grupo de los colorantes “rápidos” sensibles al voltaje, por ejemplo colorantes estirilo (colorantes ANEPPS), colorantes oxonol (por ejemplo RH421) y colorantes de hemicianina (colorantes ANINNE). También son especialmente adecuados para el formato de ensayo según la invención los sensores de voltaje basados en proteínas, por ejemplo proteínas Flash, Flare, SPARC y VSFP-1, con los cuales las células, que expresan el correspondiente canal de potasio, se transfectan de forma transitoria o estable.

- Preferentemente, para el ensayo según la invención se utilizan combinaciones de colorantes basados en FRET, en colorantes “lentos”, por ejemplo en los comercializados por las firmas Invitrogen o Axion. Un sistema colorante en base a FRET de la firma Invitrogen se puede obtener en el mercado como “Voltaje Sensor Probes” (“VSP”). Éste contiene los colorantes DisBAC₂(3) ó DisBAC₄(3), así como el fosfolípido de cumarina unido a membrana “CC2-DMPE”. También es especialmente adecuado el sistema colorante a base de FRET de la firma Axion Bioscience, que contiene la combinación de colorantes DisBAC₁(3)/DisBAC₁(5). También existen otros sistemas de colorantes FRET adecuados para el sistema de ensayo.
- Con especial preferencia se utilizan colorantes del grupo de los colorantes fluorescentes “lentos” sensibles al voltaje, por ejemplo el Kit de Potencial de Membrana o colorantes DiSBAC₂(3), DiBAC₄(3), DiOC₂(3), DiSC₃(3), DiSC₃(5).
- Preferentemente, en el formato de ensayo según la invención se seleccionan las modificaciones del potencial de membrana con ayuda de los cambios en la intensidad de fluorescencia de los colorantes sensibles al voltaje. Sin embargo, también es posible utilizar como parámetro de medición, en lugar de la intensidad de fluorescencia, un cambio dependiente del voltaje de la vida de fluorescencia de los colorantes o las proteínas fluorescentes.
- El técnico en la materia conoce de qué modo se incuban células que expresan el canal de potasio de forma adecuada con un colorante fluorescente sensible al voltaje. El tiempo de incubación, las condiciones de incubación y las proporciones células/colorante fluorescente dependen en gran medida del colorante correspondiente utilizado en cada caso y pueden averiguarse fácilmente mediante sencillos ensayos de rutina.
- Las formas de realización son ilustrativas de las realizaciones preferentes de la invención.
- Por ejemplo, para cargar células CHO que expresan los canales KCNQ con un colorante sensible al voltaje, en primer lugar éstas se retiran del medio nutriente en el que se cultivaron.
- A continuación, se lavan con un tampón apropiado. Después las células se recubren con el colorante disuelto en el tampón y se incuban durante 2 minutos a 1,5 horas. El colorante se selecciona de entre los colorantes arriba indicados. Preferentemente deberían incubarse las células con el colorante durante 30 a 45 minutos. Se consiguen resultados especialmente buenos si se incuban las células durante 45 minutos.
- Como tampón es adecuado una solución de 0,8-4 mM CaCl₂, 0-100 mM HEPES, 0,5-10 mM KCl, 0-2 mM KH₂PO₄, 0,4-4 mM MgCl₂, 0-1 mM MgSO₄, 100-200 mM NaCl, 0-40 mM NaHCO₃, 0-10 mM Na₂HPO₄, 0-20 mM D-glucosa, 0-0,05 mM rojo de fenol y 0-0,5 mM piruvato sódico. Es especialmente adecuado un tampón 1-2 mM CaCl₂, 0,5-6 mM KCl, 0,5-2 mM MgCl₂, 0,2-0,5 mM MgSO₄, 100-150 mM NaCl, 2-5 mM NaHCO₃, 0,2-0,5 mM Na₂HPO₄, 5-10 mM D-glucosa y 5-15 mM HEPES.
- Especialmente ventajoso es el lavado de las células con 200 µl de una solución extracelular (ES; 120 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM glucosa; pH 7,4) y su incubación con 100 µl de una solución colorante (Kit de Ensayo de Potencial de Membrana de 1 vial, rojo disuelto en 200 ml de una solución ES) durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- El protocolo explicado arriba a modo de ejemplo para la incubación de las células que expresan los canales de potasio con un colorante fluorescente puede ser adaptado directamente por el técnico de forma en sí conocida o mediante ensayos sencillos de rutina a las células utilizadas y al colorante empleado.
- A continuación, se añade a la mezcla de reacción el compuesto diana a ensayar. El compuesto diana se añade disuelto en un disolvente adecuado. La cantidad de compuesto diana depende del canal de iones de potasio a ensayar.
- Después de incubar con el colorante, se añade la sustancia de ensayo en una solución tampón adecuada a un porcentaje fisiológicamente compatible disolvente/vehículo, incubándose durante aproximadamente 1 minuto a 2,5 horas. El tiempo de incubación depende del tipo del canal de iones de potasio a ensayar. Los tiempos de incubación preferidos oscilan entre 15 minutos y 1,5 horas. Con especial preferencia, se incuban las células con la sustancia durante 30 minutos. La concentración de iones de potasio añadidos oscila entre 10 mM hasta 150 mM (concentración final de la solución de KCl), preferentemente de 80 mM hasta 120 mM, en particular entre 90 mM y 100 mM de KCl.
- Antes de la adición de los iones potasio, se determina el valor F₁ de la intensidad de fluorescencia en las células. La determinación de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma en sí conocida, por ejemplo con una cámara CCD o un fotomultiplicador.
- Las medidas pueden realizarse con cualquier lector de fluorescencia comercial; especialmente adecuados son BMG-Typ Fluostar ó BMG-Typ Polarstar o Molecular Devices Flex. La fluorescencia se activa a 525 nm y se detecta a 560 nm.
- A continuación se determina de nuevo la intensidad de fluorescencia de las células.
- La determinación del valor de fluorescencia F₂ se realiza en un momento constante después de la despolarización de KCl, preferentemente en el momento del máximo de la despolarización de KCl. El valor ΔF/F de la correspondiente

sustancia de ensayo se averigua utilizando el valor F_2 en el pocillo de la sustancia y el valor de fluorescencia en un momento fijado e idéntico para todas las sustancias de la línea base del pocillo de sustancia (F_1):

$$\left(\frac{F_2 - F_1}{F_1} \right) \times 100 = \frac{\Delta F}{F} (\%)$$

- 5 A este valor $\Delta F/F$ específico de la sustancia se le resta el valor medio de los valores $(\Delta F/F)_k$ de control del vehículo, registrándose así el rango dinámico específico de la sustancia (con la unidad en porcentaje). Este valor se puede identificar entonces como parte del efecto (rango dinámico) de una sustancia de referencia relevante para la proteína de destino.

Una sustancia tiene actividad agonista sobre el canal de potasio cuando $\Delta F/F$ es mayor que $(\Delta F/F)_k$:

$$\frac{\Delta F}{F} > \left(\frac{\Delta F}{F} \right)_k$$

- 10 Para distinguir una actividad agonista verdadera de una dispersión normal de los valores de medición, se aplica que, normalmente, se puede deducir la actividad agonista sólo si se cumple la siguiente condición:

$$\frac{\Delta F}{F} > \left[\left(\frac{\Delta F}{F} \right)_k + 3 * \sigma \right]$$

esto es $\Delta F/F$ está situado fuera del intervalo 3σ para las células control, donde " σ " es la desviación estándar de $(\Delta F/F)_k$.

- 15 En el caso de los canales KCNQ, preferentemente se determina la intensidad de fluorescencia después de aproximadamente 60 s. Sin embargo, el momento de determinar la intensidad de fluorescencia puede ser diferente según el canal de potasio y el equipo de medición. El técnico especialista puede averiguar el momento adecuado con ayuda de sencillas pruebas de rutina. Del cociente entre la intensidad de fluorescencia medida antes de la adición de los iones, para los que el canal iónico es permeable, y la medida después de la adición de estos iones se obtiene información sobre la actividad agonista del compuesto diana sobre el correspondiente canal iónico.
- 20 El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para una exploración de alto rendimiento (High Throughput Screening, HTS) para un abridor de los canales de potasio. Particularmente adecuado resulta aquí el cultivo de células en placas de 96 pocillos que se pueden seleccionar mediante los correspondientes lectores de fluorescencia. Sin embargo, también es posible una adaptación a placas de 384 ó 1.536 pocillos y, por tanto, otro incremento del rendimiento. Las correspondientes modificaciones son conocidas por el técnico en la materia.
- 25 Con el formato de ensayo según la invención se pueden identificar abridores de los canales de potasio de eficacia elevada. La gran sensibilidad del formato de ensayo permite identificar compuestos que actúan de modo preciso sobre canales específicos de potasio. El procedimiento según la invención es principalmente adecuado para la investigación de cualquier canal de potasio, pero especialmente de los siguientes canales de potasio: los canales de potasio dependientes del voltaje de la familia de los canales K_v .
- 30 Ejemplos de los canales de potasio citados son los canales de potasio dependientes del voltaje $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, $K_v1.7$, $K_v1.8$, $K_v2.1$, $K_v2.2$, $K_v3.1$, $K_v3.2$, $K_v3.3$, $K_v3.4$, $K_v4.1$, $K_v4.2$, $K_v4.3$, $K_v5.1$, $K_v6.1$, $K_v6.2$, $K_v6.3$, $K_v7.1$, $K_v7.2$, $K_v7.3$, $K_v7.4$, $K_v7.5$, $K_v8.1$, $K_v9.1$, $K_v9.2$, $K_v9.3$, $K_v10.1$, $K_v10.2$, $K_v11.1$, $K_v11.2$, $K_v11.3$, $K_v12.1$, $K_v12.2$, $K_v12.3$
- 35 Preferentemente, el procedimiento según la invención es adecuado para la investigación de los canales de potasio de la familia $K_v7.x$ o KCNQ.

La invención se refiere, además, a la utilización del ensayo del potencial de membrana de salto iónico, eventualmente modificado, o de un ensayo con los pasos arriba indicados, para la identificación de compuestos con una actividad agonista sobre un canal de iones potasio, en particular sobre un canal de iones potasio dependiente del voltaje.

Las figuras adjuntas explican más en detalle la invención. En las figuras:

- 40 Figura 1: Efecto de XE991 sobre el potencial de membrana en células que expresan los canales KCNQ, en un formato de ensayo de despolarización. Se representa la curva temporal de la intensidad de

fluorescencia de células CHO que expresan los canales KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) de un bloqueador conocido de los canales KCNQ (XE991, 60 μ M).

Figura 2: Efecto de la retigabina sobre el potencial de membrana de células que expresan los canales KCNQ en un formato de hiperpolarización. Se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia de células CHO que expresan los canales KCNQ en función del tiempo antes y después de la aplicación (flecha) de un abridor de canales KCNQ conocido (retigabina, 30 μ M).

Figura 3: Influencia de XE991 en la respuesta de fluorescencia después de la inyección de potasio al medio extracelular en un formato de ensayo de salto iónico para buscar bloqueadores de los canales de potasio. Se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia de células CHO que expresan los canales KCNQ en función del tiempo antes y después de la aplicación (flecha) de 100 mM de cloruro potásico.

Figura 4: Influencia de la retigabina sobre la respuesta de fluorescencia después de la inyección de potasio al medio extracelular en el formato de ensayo de salto iónico para encontrar abridores de los canales de potasio.

A) evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de células CHO que expresan los canales KCNQ, antes y después de la aplicación (flecha) de 100 mM de cloruro potásico.

B) diferencia de las evoluciones de fluorescencia en A.

Figuras 5, 6 y 7: La actividad agonista de ala retigabina (Figura 5A+B), de la sustancia A (Figura 6A+B) y de la sustancia B (Figura 7A y B) en el formato de ensayo de salto iónico para encontrar abridores de los canales de potasio.

A) se representa la evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de células CHO que expresan los canales de KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) de 100 mM de cloruro potásico. Se muestran las respuestas de fluorescencia de las células en presencia de diferentes concentraciones de retigabina (Figura 5A), sustancia A (Figura 6A) y sustancia B (Figura 7A).

B) se representan los cambios porcentuales en la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) después de aplicar 100 mM de cloruro potásico, en función de la concentración de retigabina (Figura 5B), sustancia A (Figura 6B) y sustancia B (Figura 7B).

Los siguientes ejemplos explican más en detalle la invención.

Ejemplo 1: Efecto de XE001 sobre el potencial de membrana de células que expresan los canales KCNQ en un formato de ensayo de despolarización (ejemplo de referencia)

Se realizó un cultivo adherente, en botellas de cultivo, de células CHO (células de ovario de hámster chino) que expresan los canales KCNQ2 y KCNQ3, en un medio nutriente [medio esencial mínimo (MEM) α Medium 22571 1x líquido (Invitrogen), 10% de suero fetal de ternero (FCS) (Gibco, inactivado por calor), incluidos antibióticos de selección] a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 95 % de humedad del aire. A una confluencia del 80%, se lavaron las células con 1xDPBS sin adición de Ca²⁺/Mg²⁺ y se incubaron con 2 ml de acutasa durante 15 minutos a 37°C. Las células desprendidas de la botella de cultivo celular T75 se resuspendieron en 8 ml del medio nutriente. Después de determinar el número de células con un contador de células CASY, se sembraron 20.000 células/pocillo en placas de pocillos Corning® CellBIND® 96 (negras con fondo transparente) en 100 μ l del medio nutriente y se incubaron durante 24 horas a 37°C, con un 5% CO₂ y una humedad del aire del 95%. Después se cargaron las células con el colorante rojo FMP de la firma Molecular Devices. El componente A rojo del kit de ensayo del potencial de membrana en vial (MPK, Bulk-Kit) se disolvió en 200 ml de una solución tampón extracelular (ES; 120 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM glucosa; pH 7,4). Para cargar las células con el colorante fluorescente sensible al voltaje se desechó primero el medio nutriente. A continuación se lavaron las células con 200 μ l de la sustancia tampón ES, se recubrieron con 100 μ l de la solución del colorante y se incubaron durante 45 minutos. Después de incubar con el colorante, se añadieron o 50 μ l de ES (control), o, en pocillos independientes, 50 μ l del bloqueador del canal KCNQ XE991 en concentración de saturación (concentración final 60 μ M) y se incubaron durante 2 horas 13 minutos con registro simultáneo de la fluorescencia mediante el lector. Las mediciones se realizaron con un lector de fluorescencia Fluostar o Polarstar de la firma BMG o la FlexStation de la firma Molecular Devices. La activación se produjo a una longitud de onda de 525 nm y la detección tuvo lugar a 560 nm.

En la Figura 1 se representa la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de las células CHO que expresan los canales KCNQ, antes y después de la aplicación (flecha) de un bloqueador conocido de los canales KCNQ (XE991).

Se representa el cambio porcentual en la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) referido a la intensidad promediada de fluorescencia antes de la aplicación de XE991. La evolución de fluorescencia de las células control (aplicación de la solución tampón ES) se resta de la señal de fluorescencia inducida por XE991.

Ejemplo 2: Efecto de la retigabina sobre el potencial de membrana de células que expresan los canales KCNQ en un formato de ensayo de hiperpolarización (ejemplo de comparación)

La siembra de las células sobre placas de ensayo y la carga con el colorante se realizaron exactamente igual al método descrito en el Ejemplo 1. Las mediciones se realizaron en un lector de fluorescencia Fluostar o Polarstar de la firma MMG o la FlexStation de la firma Molecular Devices. La activación se produjo a una longitud de onda de 525 nm y la detección a 560 nm. Después de la incubación con colorante, se realizó durante 5 minutos la captación de la línea base. A continuación, se añadieron o 50 μ l de sustancia tampón ES (control) o 50 μ l del agonista de KCNQ retigabina (30 μ M) y se registró durante 7,5 minutos la fluorescencia con el lector adecuado.

En la Figura 2 se representa la evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de las células CHO que expresan los canales de KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) del abridor conocido de canales de KCNQ (retigabina, 30 μ M). Se muestra el cambio porcentual en la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) referido a la intensidad promediada de fluorescencia antes de aplicar retigabina. La evolución de la fluorescencia de las células de control (aplicación de la solución tampón) se restó de la señal de fluorescencia inducida por retigabina.

Ejemplo 3: Influencia de XE991 en la respuesta de fluorescencia después de la inyección de potasio al medio extracelular en un formato de ensayo de salto iónico para buscar bloqueadores de los canales de potasio

La siembra de células que expresan KCNQ en placas de ensayo, la carga con el colorante y los equipos de medición a utilizar, así como la longitud de onda a ajustar son según el Ejemplo 1. Se añadieron 50 μ l del tampón ES (control) ó 50 μ l del bloqueador de KCNQ XE991 (60 μ M) a diferentes pocillos de una placa con las células que expresan KCNQ y se incubaron durante 30 minutos. Se registró entonces, en el lector de fluorescencia, la línea base durante 3-4 minutos y se midieron los valores de fluorescencia durante 10 minutos después de la inyección de 15 μ l de una solución de KCl (concentración final 91,8 mM) en cada pocillo.

En la Figura 3 se representa la evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de las células CHO que expresan los canales de KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) de 91,8 mM de cloruro potásico. Se muestran las respuestas de fluorescencia de las células en ausencia (Δ) y presencia (\blacksquare) del bloqueador de canal KCNQ XE991 (60 μ M). Se muestra el cambio porcentual de la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) referido a la intensidad promediada de fluorescencia antes de aplicar el potasio.

Ejemplo 4: Influencia de la retigabina en la respuesta de fluorescencia después de la inyección de potasio al medio extracelular en un formato de ensayo de salto iónico para encontrar abridores de los canales de potasio

El ensayo se realizó según el Ejemplo 3. Sin embargo, aquí se añadieron o 50 μ l de la sustancia tampón ES (control) o 50 μ l del agonista de KCNQ retigabina (30 μ M) a pocillos definidos de una placa sembrada con células que expresan KCNQ y se incubaron durante 30 minutos. A continuación se registró durante 5 minutos en el lector de fluorescencia la línea base y midieron los valores de fluorescencia durante 20 minutos después de inyectar 15 μ l de una solución de KCl (concentración final 91,8 mM) en cada cavidad de la placa. El resultado se muestra en la Figura 4.

Figura 4A): Representa la evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de células CHO que expresan canales KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) de 91,8 mM de cloruro potásico. Se muestran las respuestas de fluorescencia de las células en ausencia (Δ) y en presencia (\blacksquare) del abridor de canales KCNQ retigabina (30 μ M). Se representa la modificación porcentual de la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) referida a la intensidad promediada de fluorescencia antes de la aplicación de potasio.

Figura 4B): representa la diferencia en las evoluciones de fluorescencia en A. El desarrollo de la fluorescencia en ausencia de retigabina se restó del desarrollo de fluorescencia en ausencia de retigabina.

Ejemplo 5: Actividad agonista de la retigabina, la sustancia A y la sustancia B en el formato de ensayo de salto iónico para encontrar abridores de los canales de potasio

Para este experimento se preparó un cultivo adherente de células CHO (*células de ovario de hámster chino*) que expresan los canales KCNQ2 y KCNQ3 en un medio nutriente [Medio Esencial Mínimo (MEM) α Medium 22571 1x líquido (Invitrogen), 10% de suero de ternera fetal (FCS) (Gibco, inactivado por calor), incluidos antibióticos de selección] a 37°C, con un 5% CO₂ y humedad del aire del 95%, en botellas de cultivo celular. A una confluencia del 80%, se lavaron las células con 1xDPBS sin adición de Ca²⁺/Mg²⁺ y se incubaron con 2 ml de acetasa durante 15 minutos a 37°C. Las células desprendidas de la botella de cultivo celular T75 se resuspendieron en 8 ml del medio nutriente. Después de determinar el número de células con un contador de células CASY, se sembraron 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de Corning® CellBIND® (negras con fondo transparente) con 100 μ l de medio nutriente y se incubaron durante 24 horas a 37°C, con un 5% de CO₂ y una humedad del aire del 95%. Después se cargaron las células con el colorante rojo FMP de la firma Molecular Devices. El componente A rojo de un kit de ensayo de potencial de membrana (MPK, Bulk-kit) se disolvió en 200 ml con una solución tampón extracelular (ES; 120 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM glucosa; pH 7,4). Para cargar las células con el colorante fluorescente sensible al voltaje se desechó primero el medio nutriente. Las células se lavaron después con 200 μ l de la solución tampón ES y a continuación se recubrieron con 100 μ l de la solución del colorante y se incubaron

5 durante 45 minutos. Después de la incubación con el colorante, se añadieron a pocillos determinados de la placa de ensayo o bien 50 μ l de la solución tampón ES (control) o bien 50 μ l del agonista KCNQ retigabina, la sustancia A o la sustancia B y se encubaron durante 30 minutos. Las concentraciones finales en la mezcla del abridor KCNQ aquí utilizado son de 0,0625, 0,625, 0,125, 1,25, 2,5, 5 y 10 μ M. A continuación se registró con el lector de fluorescencia la línea base durante 4-5 minutos, seguido de una inyección de 15 μ l de una solución de KCl (concentración final 91,8 mM) en cada cavidad de la placa e, inmediatamente después, se midió con el lector durante los siguientes 15 minutos. Las mediciones se realizaron con un lector de fluorescencia Fluostar o Polarstar de la firma MB o la FlexStation de la firma Molecular Devices. La activación se produjo a una longitud de onda de 525 nm y la detección a 560 nm.

Los resultados se muestran en las Figuras 5A + B, 6A + B y 7A + B.

10 A) Se representa la evolución en función del tiempo de la intensidad de fluorescencia de las células CHO que expresan los canales KCNQ antes y después de la aplicación (flecha) de 91,8 mM de cloruro potásico. Se muestran las respuestas fluorescentes de las células en presencia de diferentes concentraciones de retigabina (Figura 5A), sustancia A (Figura 6A) y sustancia B (Figura 7A). Las células se incubaron en cada caso con el kit de potencial de membrana (Molecular Devices). Se representa en cada caso el cambio porcentual de la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) referido a la intensidad fluorescente antes de la aplicación de potasio. El desarrollo de la fluorescencia en las células de control, a las que no se aplicó ningún activador, se restó de los desarrollos de fluorescencia representados.

15 B) Se representan los cambios porcentuales en la intensidad de fluorescencia ($\Delta F/F$) después de la aplicación de 91,8 mM de cloruro potásico, en función de la concentración de retigabina (Figura 5B), sustancia A (Figura 6B) y sustancia B (Figura 7B). Se restó el $\Delta F/F$ para las células de control (en ausencia del activador). Se adaptó una curva dosis-respuesta a los puntos de datos con ayuda de la ecuación de Hill y se averiguaron los valores EC50 así indicados para la actividad agonista.

Ejemplo 6: Prueba de los agonistas de KCNQ

25 La siguiente prueba describe un protocolo preferente con el que se pueden investigar los canales de potasio sensibles al voltaje (representado con el ejemplo de los canales de KCNQ) con vistas a encontrar abridores del canal. Con este protocolo se pueden ensayar todos los tipos de abridores de canales de potasio o sus agonistas. Para este fin se pueden utilizar los colorantes fluorescentes arriba indicados.

30 Para cultivar las células CHO (*células de ovario del hámster chino*) que expresan los canales KCNQ, éstas se cultivan adherentemente en Medio Esencial Mínimo (MEM) α Medium 22571 1x líquido (Invitrogen) con 10% de suero fetal de ternera (FCS) (Gibco, inactivado por calor) y antibióticos de selección a 37°C, con un 5% de CO₂ y una humedad del aire del 95%. Para este fin se utilizan TC Flask 80 cm² (Nunc) como botellas de cultivo celular.

35 Se disponen las células retirando primero el medio de cultivo y lavándolas a continuación con una solución tampón 0,9 mM CaCl₂, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl y 8 mM Na₂HPO₄. Para desprender las células de la botella de cultivo, se añadieron 2 ml de acutasa (PAA Laboratories). Se incubaron durante 15 minutos a 37°C desprendiéndose las células. Las células se sueltan del fondo de las botellas de cultivo celular dando un golpe con la mano plana sobre el borde del recipiente de cultivo.

40 La determinación del número de células presentes se realizó con un equipo contador de células CASY modelo TCC (sistema Schärfe). Se sembraron las células en nuevos recipientes de cultivo con 20 ml del medio. Se sembraron las siguientes cantidades de células (A = día de la siembra de células, E = día de la cosecha de células): A: lunes – E: jueves \rightarrow células $4 \cdot 10^5$; A: lunes – E: viernes \rightarrow células $3 \cdot 10^5$; A: jueves – E: lunes \rightarrow células $3 \cdot 10^5$; A: viernes – E: martes \rightarrow células $3 \cdot 10^5$; A: viernes – E: miércoles \rightarrow células $2 \cdot 10^5$.

45 Para la siembra de las células en placas de 96 pocillos, éstas se lavaron según se describe más arriba y se desprendieron del recipiente de cultivo. Después de determinar el número de células presentes, se sembraron 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos Corning® CellBIND® (negras con fondo transparente) con 100 μ l del medio nutriente descrito y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente sin aporte de gas o regulación de la humedad del aire y durante 24 horas a 37°C, con un 5% CO₂ y una humedad del aire del 95%.

50 Para cargar las células con el colorante fluorescente sensible al voltaje utilizado, se disolvió un componente rojo A de un kit de ensayo de potencial de membrana de vial (MPK, Bulk-Kit) en 200 ml de una solución extracelular (ES; 120 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM glucosa; pH 7,4). Se desechó el medio nutriente que cubría las células. Se lavaron con 200 μ l de la solución tampón ES, a continuación se recubrieron con 100 μ l de la solución colorante y se incubaron en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente sin aporte de gas ni regulación de la humedad del aire.

55 Las mediciones de fluorescencia se realizaron con un lector de fluorescencia Fluostar (BMG). La fluorescencia se activa a 525 nm y se detecta a 560 nm. Después de la incubación con el colorante, se añadió la sustancia a ensayar con la concentración deseada a 50 μ l volumen o al control de 50 μ l ES y se incubó durante 30 minutos. A continuación se registró durante 5 minutos la intensidad de fluorescencia del colorante en los pocillos. Después se añadió una segunda

ES 2 399 939 T3

inyección de 15 μ l de una solución de KCl de 100 mM (concentración final 91,8 mM). El cambio de la fluorescencia se observó durante 340 minutos para obtener todos valores relevantes de medición.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación de la actividad agonista de un compuesto diana sobre un canal de potasio dependiente del voltaje, caracterizado porque
 - a) se prepara una población de células que expresan dicho canal de potasio;
 - 5 b) se incuban las células de a) con un colorante fluorescente sensible al voltaje;
 - c) se añade el compuesto diana a la mezcla de reacción de b);
 - d) se determina un valor F1 de la intensidad de fluorescencia de las células;
 - e) se añaden iones potasio en una concentración fisiológicamente compatible;
 - f) se determina un valor F2 de la intensidad de fluorescencia de las células;
 - 10 g) se compara la intensidad de fluorescencia F2 con la intensidad de fluorescencia F1 y se averigua la actividad agonista del compuesto diana sobre el canal de potasio.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la población de células que expresan un canal de potasio, expresan además un sensor de voltaje óptico fluorescente basado en proteínas, el paso b) se suprime y se añade el compuesto diana a la mezcla de reacción de a).
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se selecciona el canal de potasio dependiente del voltaje de la familia de los canales K_v .
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el canal de potasio dependiente del voltaje de la familia de los canales K_v es un canal de la familia $K_{v7.x}$ o KCNQ.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la población de células que expresan el canal de potasio se selecciona de entre células transitorias transfectadas, líneas de células estables, cultivos de células primarias o células de tejido o células que expresan un canal de potasio de modo endógeno.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el colorante fluorescente es un colorante fluorescente sensible al voltaje.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el colorante fluorescente sensible al voltaje se selecciona entre colorantes lentos o rápidos, combinaciones de colorantes basados en FRET o sensores de voltaje ópticos fluorescentes basados en proteínas.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el colorante fluorescente sensible al voltaje es un colorante rápido sensible al voltaje seleccionado de entre colorantes de estirilo, colorantes de oxonol o colorantes de hemicianina.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque el colorante sensible al voltaje es un colorante fluorescente sensible al voltaje lento seleccionado de entre Dis BAC₂(3), Di BAC₄(3), Di OC₂(3), Dis C₃(3), Dis C₃(5), sistemas de colorantes basados en FRET que contienen Dis BAC₂(3) ó Dis BAC₄(3) y el fosfolípido unido a membrana cumarina CC₂-DM PE o que contiene Dis BAC₂(3)/Dis BAC₁(5), colorantes de carbocianina, colorantes de rodamina, colorantes de oxonol y bisoxonol o colorantes de merocianina.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el procedimiento está adaptado a una utilización con exploración de alto rendimiento.

Figura 1

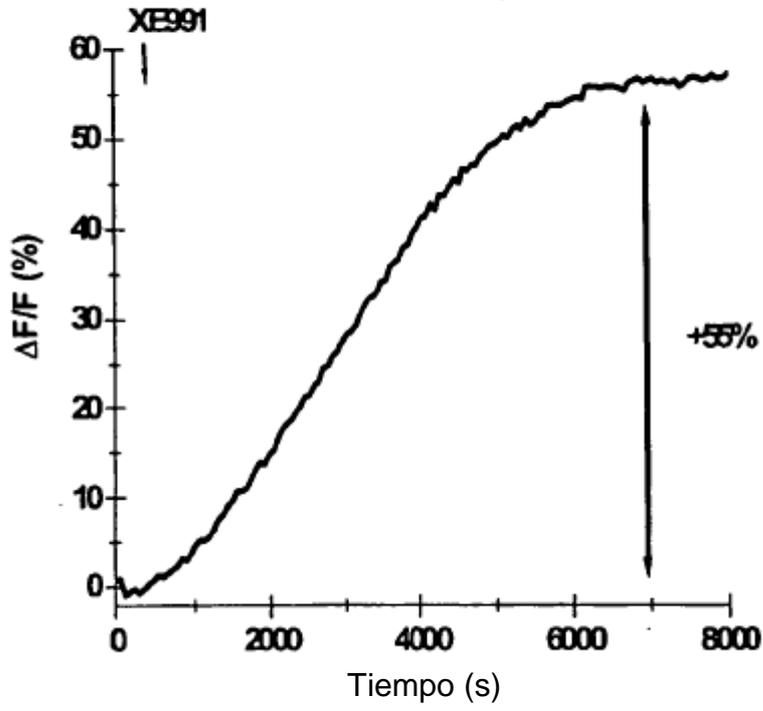


Figura 2

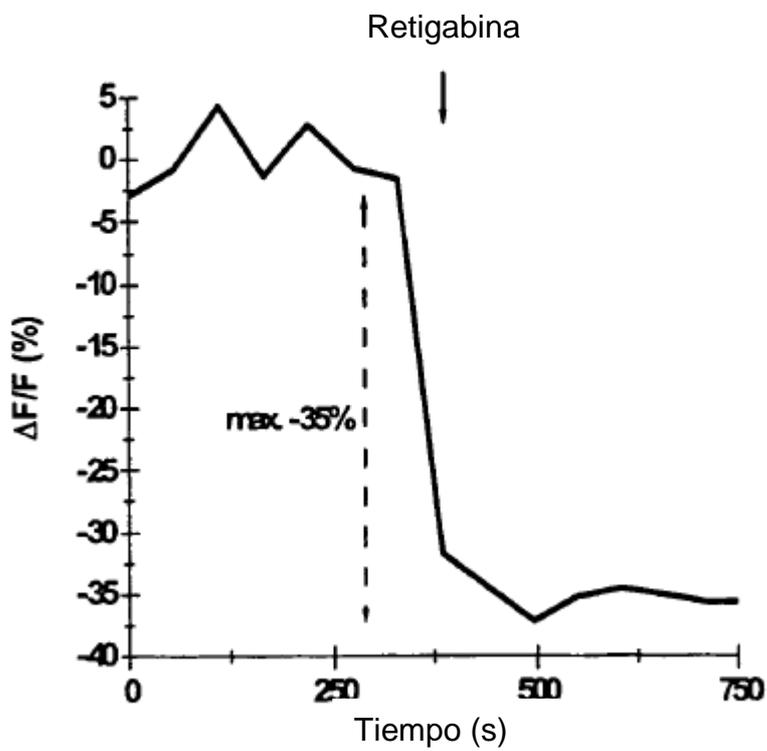


Figura 3 3

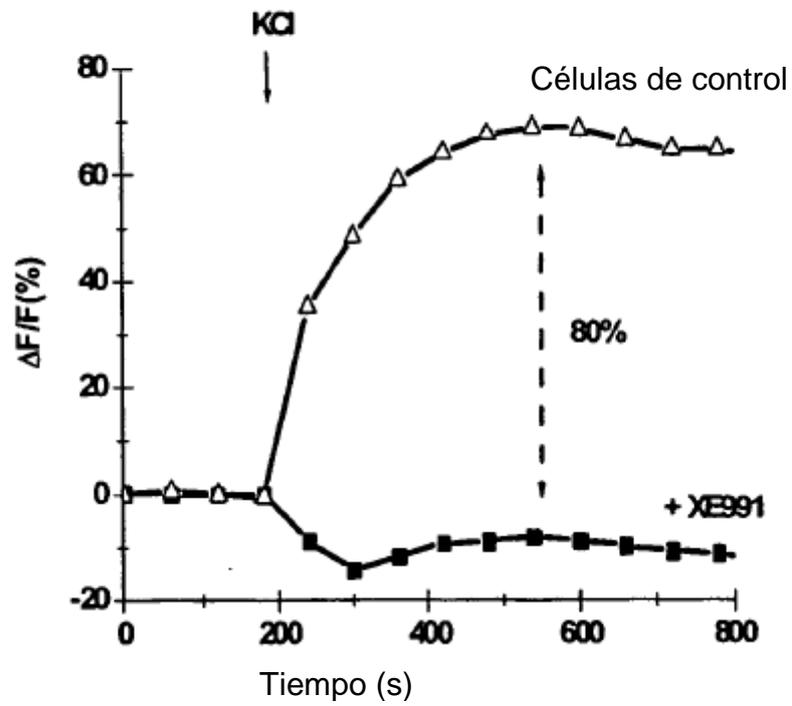


Figura 4A

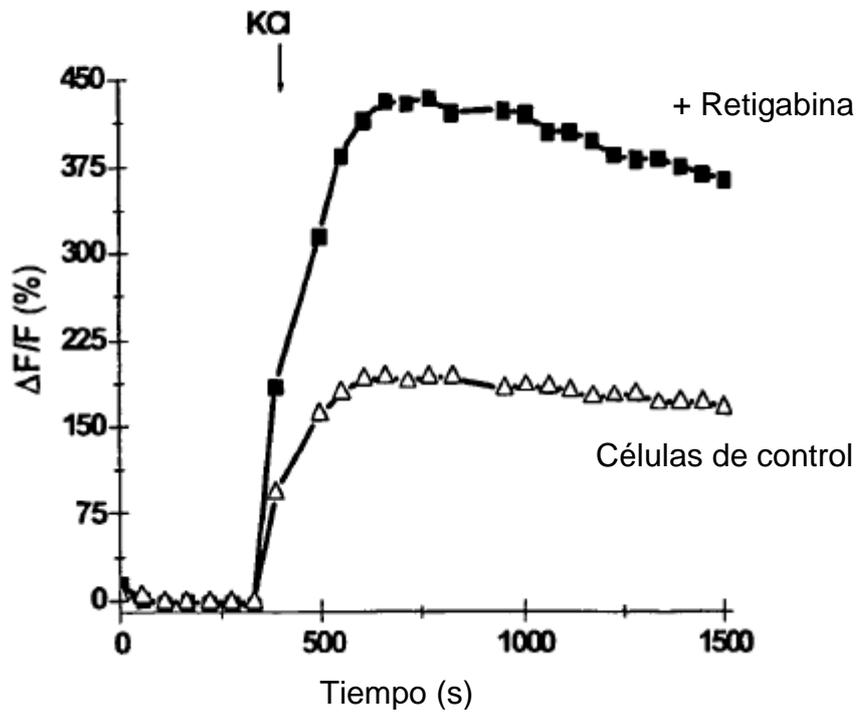


Figura 4B

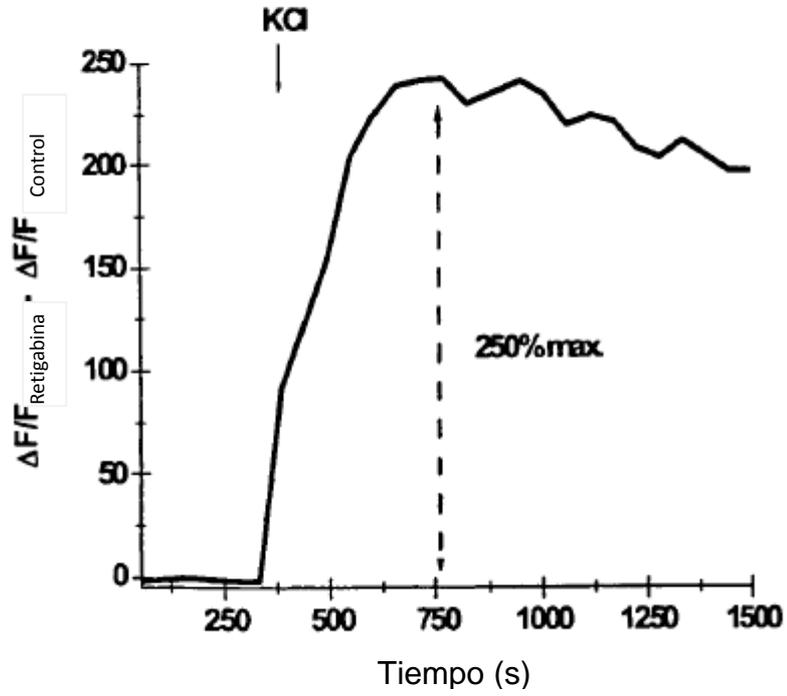


Figura 5A

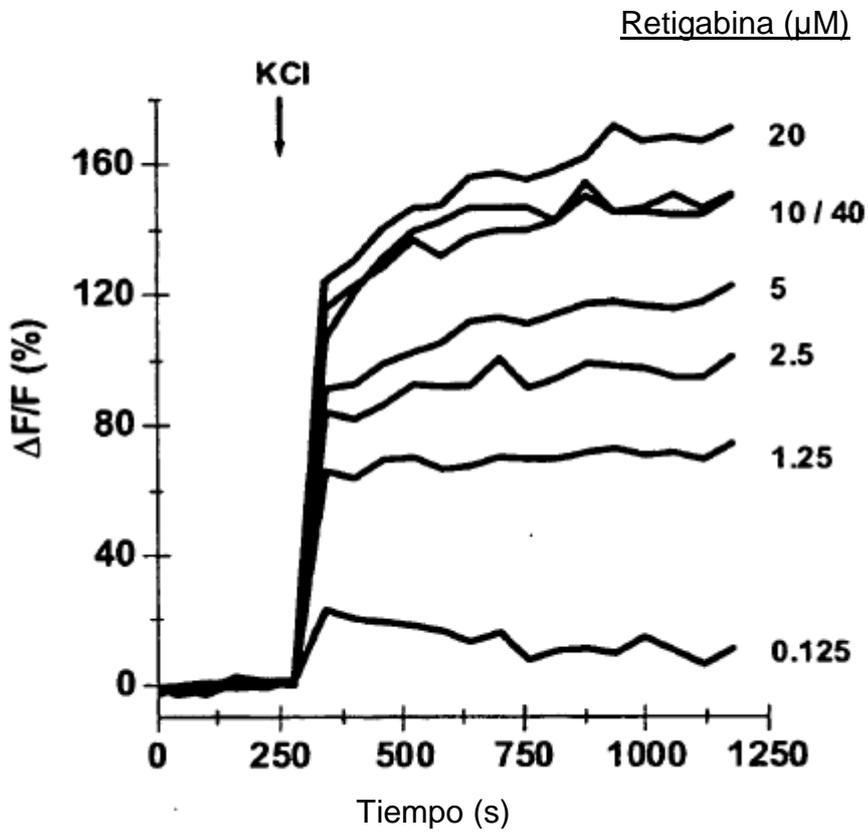


Figura 5B

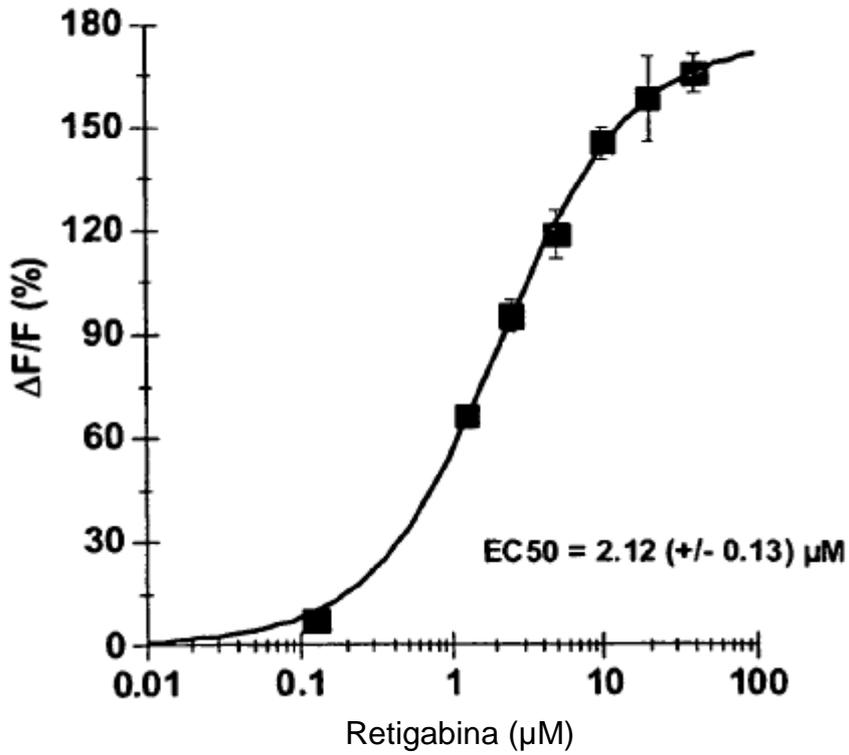


Figura 6A

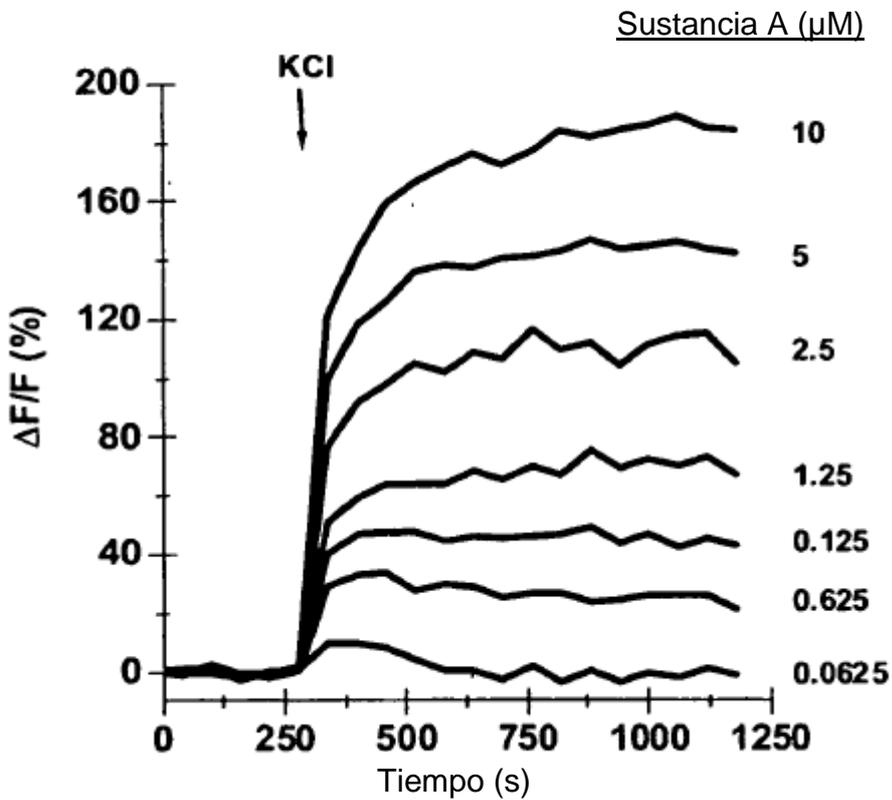


Figura 6B

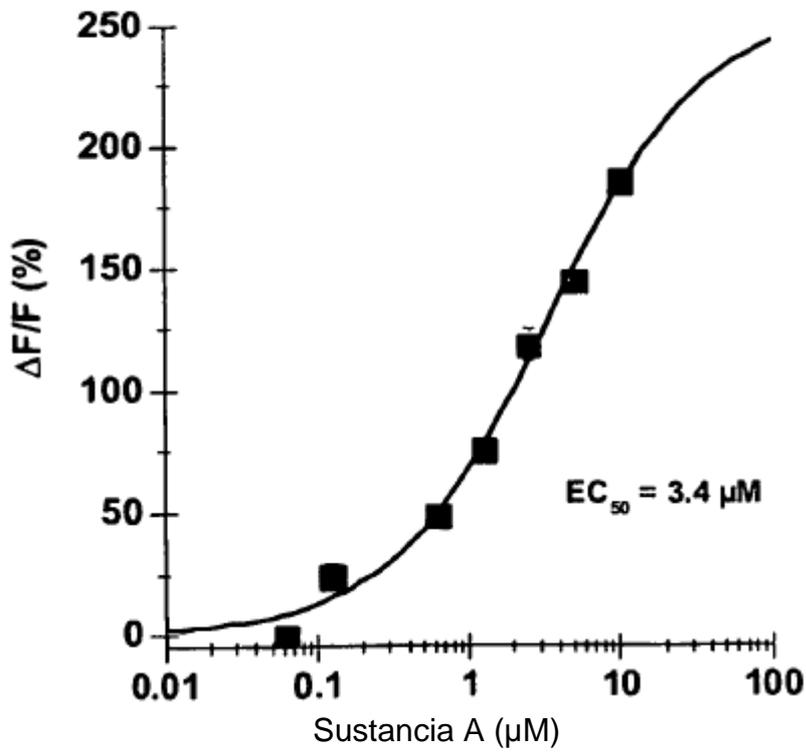


Figura 7A

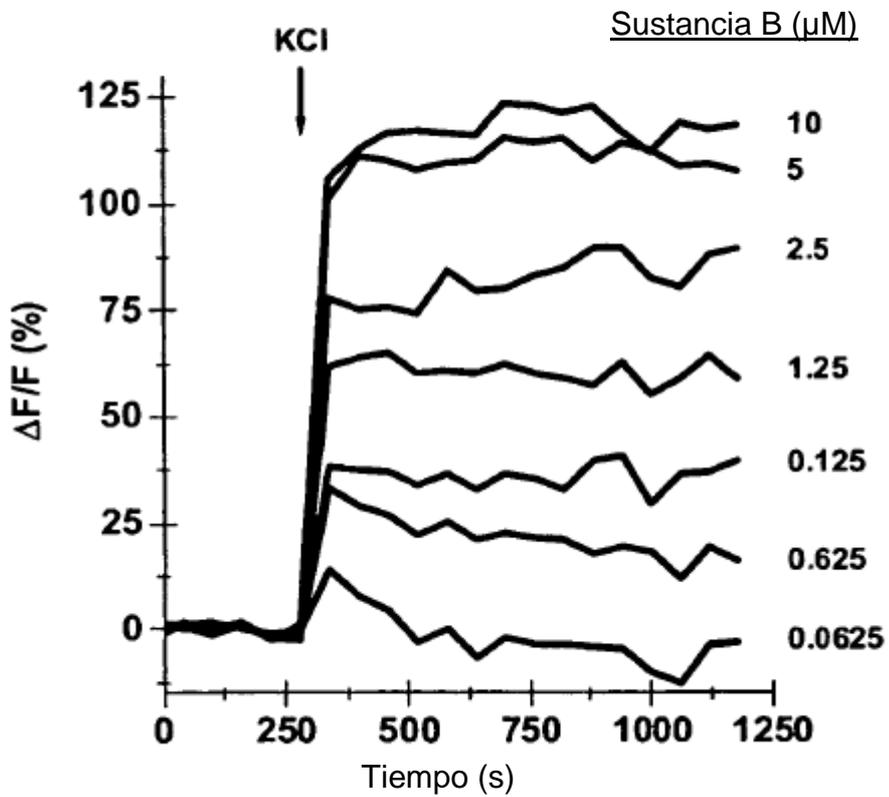


Figura 7B

