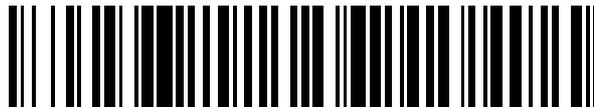


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 523**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05741434 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1760158**

54 Título: **Método de ensayo de una sustancia capaz de cambiar el potencial de membrana mitocondrial**

30 Prioridad:

18.05.2004 JP 2004147418

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION
(100.0%)**

**2-6-18, Kitahama, Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 541-8505, JP**

72 Inventor/es:

**UMEDA, ASAMI y
NAGAKI, SUMIKO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 523 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

Método de ensayo de una sustancia capaz de cambiar el potencial de membrana mitocondrial

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método de ensayo de una sustancia capaz de cambiar el potencial de membrana mitocondrial. Alternativamente, se refiere a un método de ensayo de una sustancia que inhibe la entrada de calcio en las mitocondrias. Más concretamente, la presente invención se refiere a un método de ensayo de un abridor del canal de K^+ sensible a ATP (canal de K^+ sensible a ATP mitocondrial, denominado en lo sucesivo canal mito K_{ATP}) en la membrana mitocondrial interna.

Técnica anterior

10 Se sabe que el canal de K^+ sensible a ATP de la membrana celular (denominado en lo sucesivo, canal sarc K_{ATP}) está presente en la membrana celular del miocardio, la membrana celular del músculo liso y la membrana de las células β pancreáticas, y regula la concentración de calcio en el citoplasma (véase la referencia no de patente 1). Convencionalmente, los abridores del canal K_{ATP} en la membrana celular del miocardio y de la membrana celular del músculo liso se han estudiado como fármacos terapéuticos para la angina de pecho y la hipertensión. El bloqueador
15 del canal K_{ATP} de la membrana celular β -pancreática se ha comercializado como un fármaco terapéutico para la diabetes.

En los últimos años, se ha sido farmacológicamente y fisiológicamente que el canal mito K_{ATP} está presente y se puede prevenir la lesión isquémica de las células mediante la apertura del canal (véase la referencia no de patente 2).

20 Durante la isquemia, en la célula, la actividad Na/K ATPasa en la membrana celular disminuye debido al cese de la producción de energía, y aumenta la concentración intracelular de Na. Tras la reperfusión del flujo sanguíneo, el Na intracelular que aumenta durante la isquemia es intercambiado por Ca extracelular para aumentar el Ca intracelular. El influjo de Ca en la mitocondria aumenta la concentración de Ca intramitocondrial y despolariza la membrana mitocondrial interna. Por otra parte, las especies reactivas del oxígeno producidas por reperfusión también
25 promueven la despolarización de la membrana mitocondrial interna.

Cuando el canal mitoKATP se abre previamente, se puede inhibir el influjo de Ca a la mitocondria durante la reperfusión, y también se inhibe la despolarización de la membrana mitocondrial interna (véase la referencia no de patente 3).

30 Para el estudio de la relación entre la acción de apertura del canal mito K_{ATP} y la patología, se conocen generalmente (1) un método de ensayo que utiliza una línea celular tal como células Girardi, células PC12, células SHSY-5Y, células de neuroblastoma humano, células de músculo cardiaco de rata cultivadas primarias y similares, (2) un método de ensayo que utiliza mitocondrias aisladas de una célula mediante centrifugación, (3) un método basado en el ensayo del efecto sobre el corazón aislado y similares.

35 Además, se ha informado sobre el siguiente método de ensayo utilizando células Girardi (GIRARDI HEART: ECACC Núm. 9312082).

(1) Se sembraron células Girardi en una placa de cultivo de 24 pocillos, se añadieron adenosina o diazóxido (abridor del canal de mito K_{ATP}), las células se cultivaron durante 3 horas en un medio de cultivo acidulado que contenía un inhibidor del metabolismo y similares, en condiciones de bajo contenido de oxígeno para reproducir un estado de isquemia, y se cultivaron adicionalmente durante 1 hora en un medio de cultivo normal a una concentración de oxígeno normal. Por lo tanto, para evaluar el nivel de la apoptosis, se añadió un indicador de muerte celular PI (yoduro de propidio), y las células se trataron con tripsina y EDTA para ponerlas en flotación. Se midió la fluorescencia a 565-640 nm emitida por las células muertas que habían incorporado PI por citometría de flujo, y se determinó la distribución del número de células. Además, sin el tratamiento de las células con PI y tripsina, se midió la concentración de ácido láctico deshidrogenasa en el sobrenadante del cultivo. Como resultado, la adenosina
40 inhibió fuertemente la apoptosis, y quedó claro que el efecto derivaba de la acción de apertura del canal de mito K_{ATP} a través de la activación del sistema de la p38MAP quinasa (véase la referencia no de patente 4).

Alternativamente, (2) se sembraron células Girardi sobre una placa de cultivo de 6 o 24 pocillos, se cultivaron durante un tiempo dado en un medio de cultivo que contenía colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial JC-1, y a continuación en un medio de cultivo que contenía agente de despolarización mitocondrial CCCP, y se examinó el cambio en la intensidad de fluorescencia de color rojo, que es un índice del potencial de membrana mitocondrial, mediante citometría de flujo. Como resultado, se observaron una disminución de la intensidad de fluorescencia y una despolarización de la mitocondria (véase la referencia no de patente 5).

Varias otras publicaciones (documentos WO 00/19200 A; WO 00/79274 A; WO 00/68686 A; Ishida, H. et al., Naunyn Schmiedebergs Arch, Pharmacol. (2004) vol. 369, Núm. 2, págs. 192-197; Sato T. et al., The Journal of

Pharmacology and Experimental Therapeutics (2003) vol. 307, Núm. 3, págs. 955-960) describen el uso de colorantes fluorescentes para medir los cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

5 Mientras tanto, existe un informe que confirma la acción de apertura del canal de mitoK_{ATP} del diazóxido en células de músculo cardíaco neonatal de rata cultivadas primarias, utilizando las propiedades de ouabaína, un inhibidor de la Na/K ATPasa de la membrana celular, para aumentar la concentración intracelular de Ca y la concentración intramitocondrial de Ca (véase la referencia no de patente 6).

Sin embargo, los métodos convencionales se asocian con aspectos que todavía tienen que mejorar.

10 Para ser más específicos, en los métodos mencionados anteriormente, (1) durante el cultivo en condiciones de bajo oxígeno, el entorno de cultivo es difícil de mantener a un nivel constante y los niveles de lesión varían fácilmente entre los pocillos; (2) es necesario preparar células en gran cantidades puesto que la lesión celular se determina por citometría de flujo o medición de la concentración de ácido láctico deshidrogenasa; (3) en la citometría de flujo, la operación hasta la detección de fluorescencia es complicada, y (4) en la medición de la concentración de ácido láctico deshidrogenasa, la medición de la absorbancia es complicada.

15 Por otra parte, se ha informado de un método de escrutinio de un compuesto influyente en el potencial de oxidación-reducción de la mitocondria, que se basa en la medición del cambio de fluorescencia, (referencia de patente 1). Sin embargo, incluso mediante el método descrito en la patente de referencia 1, el ensayo de una muestra requiere una operación complicada y una cantidad considerable de tiempo de funcionamiento.

20 Como se describió anteriormente, puesto que los métodos convencionales tienen dificultades para reproducir condiciones constantes, y puesto que el tiempo y el trabajo necesarios para el ensayo son enormes, los métodos no son adecuados para un ensayo simultáneo de un gran número de agentes farmacéuticos.

referencia de patente 1: WO99/53024

referencia no de patente 1: Kidney Int. 57, 838, 2000

referencia no de patente 2: Circ Res. 84, 973, 1999

referencia no de patente 3: Cardiovasc. Res. 55, 534, 2002

25 referencia no de patente 4: Basic Res. Cardiol. 95, 243, 2000

referencia no de patente 5: Cardiovasc. Res. 51, 691, 2001

referencia no de patente 6: Circ. Res. 89, 856, 2001

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

30 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método de ensayo conveniente y de alta precisión de un agente farmacéutico que cambia el potencial de membrana mitocondrial, utilizando el potencial de membrana mitocondrial de una célula cultivada como un índice.

Medios para resolver los problemas

35 Los autores de la presente invención cultivaron células Girardi, tiñeron las mitocondrias con colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial JC-1, determinaron la proporción de la intensidad de fluorescencia del monómero de JC-1 y la fluorescencia del agregado J (monómero/agregado J), desarrollada por la luz de excitación, por medio de un lector de placas de fluorescencia, y midieron el potencial de la membrana mitocondrial con la proporción de la intensidad de fluorescencia como índice. Como resultado, han encontrado que una adición simultánea de KCl a ouabaína da como resultado una despolarización mitocondrial en un corto período de tiempo con buena reproducibilidad. Por otra parte, han encontrado que la adición de una sustancia de ensayo al sistema de ensayo permite el ensayo de la actividad inhibitoria de la despolarización mitocondrial, es decir, si una sustancia de ensayo tiene una actividad como abridor del canal de mitoK_{ATP}, así como la intensidad de la actividad, y adicionalmente han llevado a cabo más estudios intensivos, que han dado como resultado en la finalización de la presente invención.

45 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, siendo ilustradas adicionalmente las realizaciones preferidas de la invención en las reivindicaciones dependientes. En consecuencia, la presente invención se refiere a los métodos de ensayo de los siguientes apartados (1) a (18).

50 (1) La presente invención proporciona un método de ensayo de una sustancia que cambia el potencial de membrana mitocondrial, que comprende la adición de un regulador de la permeabilidad a iones de la membrana celular. Puesto que el potencial de la membrana mitocondrial puede cambiar debido al influjo de calcio a las mitocondrias, la

presente invención también abarca un método de ensayo de una sustancia que inhibe la entrada de calcio a las mitocondrias.

El método de ensayo de la invención comprende las siguientes etapas de:

- (a) poner en contacto una célula cultivada con una sustancia de ensayo,
- 5 (b) poner en contacto la célula cultivada con ouabaína a una concentración de iones de potasio 20-90 mM, y
- (c) medir el cambio en el potencial de membrana mitocondrial de la célula cultivada, y
- (d) seleccionar una sustancia de ensayo que cambia el potencial de membrana mitocondrial de la célula cultivada. Por lo tanto, el orden de (a) y (b) no es importante en la presente invención, donde (a) puede o no puede preceder a (b) en la presente invención, y (a) y (b) puede llevarse a cabo simultáneamente.
- 10 (2) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (1) anteriormente mencionado, en donde la sustancia del apartado (d) inhibe la apoptosis celular.
- (3) La presente invención proporciona el método de ensayo de los apartados (1) o (2) anteriormente mencionados, en donde la sustancia del apartado (d) inhibe el influjo de calcio a las mitocondrias.
- 15 (4) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (3) anteriormente mencionados, en donde la sustancia del apartado (d) actúa sobre el canal de K^+ sensible a ATP mitocondrial.
- (5) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (4) anteriormente mencionados, en donde la célula cultivada tiene una alta sensibilidad a un regulador de la permeabilidad a iones de la membrana celular.
- 20 (6) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (5) anteriormente mencionado, en donde la célula cultivada tiene una alta sensibilidad a un inhibidor de la Na/K ATPasa.
- (7) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (6) anteriormente mencionado, en donde la célula cultivada que tiene una alta sensibilidad a la ouabaína.
- 25 (8) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (7) anteriormente mencionados, en donde la célula cultivada es una línea celular.
- (9) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (8) anteriormente mencionado, en donde la célula cultivada es una línea celular humana.
- (10) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (9) anteriormente mencionado, en donde la célula cultivada deriva de corazón, cerebro, nervio, hígado o páncreas humanos.
- 30 (11) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (10) anteriormente mencionado, en donde la célula cultivada es una célula de Girardi.
- (12) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (11) anteriormente mencionados, en donde la célula cultivada es cultivada sobre una placa utilizable para un método de medición óptica.
- 35 (13) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (4) anteriormente mencionados, en donde el regulador de la permeabilidad a iones de la membrana celular induce el cambio en el potencial de membrana mitocondrial.
- (14) La presente invención proporciona el método de ensayo de los apartados (1) a (13) anteriormente mencionados, en donde la ouabaína tiene una concentración de 0,1 μ M - 3 mM.
- 40 (15) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (1) a (4) anteriormente mencionados, en donde el cambio en el potencial de membrana se mide mediante el color fluorescente de un colorante fluorescente incorporado a la célula.
- (16) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (15) anteriormente mencionado, en donde el colorante fluorescente desarrolla dos colores.
- 45 (17) La presente invención proporciona el método de ensayo del apartado (16) anteriormente mencionado, en donde el cambio en el potencial de membrana se mide por la proporción de los dos colores fluorescentes.
- (18) La presente invención proporciona el método de ensayo de uno cualquiera de los apartados (15) a (17) anteriormente mencionados, en donde el colorante fluorescente es JC-1.

Efecto de la invención

Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar un agente farmacéutico que actúa selectivamente sobre el canal de mitoK_{ATP}.

5 Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar un agente farmacéutico que cambia el potencial de membrana mitocondrial convenientemente con alta precisión.

Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar un agente farmacéutico que cambia el potencial de membrana mitocondrial en un corto período de tiempo.

Breve descripción de los dibujos

10 La Fig. 1 muestra el ensayo de la acción de despolarización mitocondrial de BMS-191095, en donde la concentración de BMS-191095 y la diferencia en la proporción de la intensidad de fluorescencia se utilizaron como índices (Ejemplo 1).

La Fig. 2 muestra el ensayo de la acción de despolarización mitocondrial del diazóxido, en donde la concentración de diazóxido y la diferencia en la proporción de intensidad de fluorescencia se utilizaron como índices (Ejemplo 1).

15 La Fig. 3 muestra la relación entre la concentración de levromakalim y la proporción de intensidad de fluorescencia (Ejemplo 1).

La Fig. 4 muestra la relación entre la concentración de diltiazem y la proporción de intensidad de fluorescencia (Ejemplo 1).

20 La Fig. 5 muestra el ensayo de la acción de despolarización mitocondrial de BMS-191095, en donde la concentración de BMS-191095 y la diferencia en la proporción de intensidad de fluorescencia se utilizaron como índices (Ejemplo 2).

Mejor modo de representar la invención

25 En la presente invención, se evalúa la capacidad de una sustancia de ensayo para cambiar el potencial de membrana mitocondrial mediante el uso, como índice, el cambio en el potencial de membrana mitocondrial, que se produce al poner en contacto un regulador de la permeabilidad a iones en una membrana celular con una célula cultivada, en donde el cambio se mide como una variación en la intensidad de fluorescencia de un colorante fluorescente. Además, la presente invención se pone en práctica preferiblemente en condiciones de alta concentración de iones potasio.

30 De acuerdo con la presente invención, se puede seleccionar una sustancia que cambia el potencial de membrana mitocondrial, por medio de lo cual se pueden seleccionar una sustancia capaz de inhibir la apoptosis celular, una sustancia capaz de inhibir el influjo de calcio a las mitocondrias, y una sustancia capaz de actuar sobre el canal de K⁺ sensible al ATP de la mitocondria.

35 La célula cultivada que se va a utilizar en la presente invención es preferiblemente una célula cultivada que tiene una alta sensibilidad a un regulador de la permeabilidad a iones de la membrana celular, particularmente una inhibidor de la Na/K ATPasa, más preferiblemente una célula cultivada que tiene una alta sensibilidad a la ouabaína. La célula que tiene "alta sensibilidad" representa una célula que muestra un cambio suficiente en el potencial de membrana mediante la adición de un regulador de la permeabilidad a los iones, un inhibidor de la Na/K ATPasa o la ouabaína y, por ejemplo, una célula que muestra una proporción de intensidad de fluorescencia significativamente diferente mediante la adición de un regulador de la permeabilidad a iones, un inhibidor de la Na/K ATPasa o la ouabaína, en comparación con las condiciones de cultivo sin adición.

40 La célula cultivada que se va a utilizar en la presente invención representa una línea celular o una célula cultivada primaria. Un ejemplo preferible de las mismas es una línea celular, más preferiblemente una línea celular humana. La "línea celular humana" se refiere a una línea celular establecida derivada de un tejido humano, que ha adquirido una capacidad de proliferación infinita. De tales líneas celulares humanas, es más preferible una derivada de un órgano o tejido humano, tal como el corazón, cerebro, nervios, hígado, páncreas y similares.

45 La "célula Girardi" que se va a utilizar en la presente invención representa una célula de Girardi (GIRARDI HEART, ECACC Núm. 9312082) derivada de corazón humano, que está disponible en la Colección Europea de Cultivos Celulares.

50 La "sustancia de ensayo" que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitada siempre que se puede añadir al sistema de ensayo de la presente invención y, por ejemplo, un extracto celular, un sobrenadante de cultivo celular, un derivado fermentativo de corazón humano, que está disponible en la Colección Europea de Cultivos Celulares.

La "sustancia de ensayo" que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitada siempre que se puede añadir al sistema de ensayo de la presente invención y, por ejemplo, se pueden mencionar, un extracto celular, un sobrenadante de cultivo celular, un producto de un microorganismo fermentativo, un extracto de organismo marino, un extracto botánico, una proteína purificada o purificada en bruto, un péptido, un compuesto no peptídico, un ácido nucleico, un compuesto de bajo peso molecular sintetizado, un compuesto natural, y similares.

La concentración de ouabaína es preferiblemente de 0,1 μM - 3 mM, más preferiblemente de 100 μM - 2 mM.

El "contacto la célula cultivada con una sustancia de ensayo" en la presente invención no está particularmente limitado, con tal que la célula cultivada se pueda poner en contacto con una sustancia de ensayo y, por ejemplo, se pueden mencionar las etapas en las que se encuentra presente una sustancia de ensayo en un medio de cultivo celular, tal como la adición de una sustancia de ensayo a un medio de cultivo celular en cultivo, el cultivo de células en un medio de cultivo celular ajustado de antemano mediante la adición de una sustancia de ensayo y similares, y similares.

El "contacto la célula cultivada con ouabaína" en la presente invención no está particularmente limitado, con tal que la célula cultivada se pueda poner en contacto con ouabaína y, por ejemplo, se pueden mencionar la adición de ouabaína a un medio de cultivo celular en cultivo, el cultivo de células en un medio de cultivo celular ajustado de antemano mediante la adición de ouabaína y similares, y similares.

En cuanto al modo de realización de la presente invención, se pueden mencionar una realización en donde un medio de cultivo celular que contiene una sustancia de ensayo y un medio de cultivo celular que contiene ouabaína se preparan por separado, y estos medios de cultivo celular se añaden a las células para el cultivo de las mismas, una realización en la que se prepara un medio de cultivo celular que contiene una sustancia de ensayo y ouabaína, que se añade a las células para el cultivo de las mismas.

El "medio de cultivo celular" que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitado con tal que la célula objeto se pueda cultivar y se puede utilizar cualquier medio que contiene suero, medio sin suero, tampón y similares.

La "alta concentración de ión potasio" en la presente invención representa una concentración mayor que la de un ión de potasio (5-10 mM) generalmente utilizado para el cultivo de células, y es preferiblemente 20-90 mM. El método para el ajuste del ión potasio se ilustra, pero no está limitado a, la adición de una cantidad dada de KCl.

La "placa utilizable para un método de medición óptica" en la presente invención se refiere principalmente a una placa de color negro de fondo transparente o una placa de color negro de 96 pocillos. Además de éstas, como placa para el cultivo celular medible en un lector de placa de fluorescencia se pueden mencionar, por ejemplo, placas de 384, 48, 24, 12 y 6 pocillos y similares.

El "colorante fluorescente" en la presente invención representa un colorante fluorescente sensible a un cambio en el potencial de membrana mitocondrial y, por ejemplo, pueden mencionar JC-1.

"JC-1" (a veces referido como "colorante sensible al potencial de membrana mitocondrial JC-1") es yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (Molecular Probes T-3168). Este compuesto es absorbido en la célula, migra a la mitocondria, y forma un agregado denominado agregado J cuando la mitocondria es normal y la diferencia de potencial desde el exterior es de alrededor de -180 mV. El agregado emite fluorescencia de color rojo que tiene un pico a 590-600 nm por la excitación a 488-490 nm. Por otra parte, JC-1 en el citoplasma se convierte en un monómero emisor de fluorescencia verde que tiene un pico a 527 nm. Cuando las mitocondria se despolariza, JC-1 no pueden formar agregado J, y por lo tanto, disminuye la fluorescencia roja y aumenta la fluorescencia verde. Utilizando dicha propiedad, se detecta la proporción de intensidad de fluorescencia del monómero/agregado J para observar el potencial de membrana mitocondrial.

El esquema del método de ensayo de la presente invención se muestra a continuación.

En primer lugar, las células Girardi se siembran en una placa utilizable para un método de medición óptica, y se cultivan en un medio normal (medio MEM con un suplemento con aditivos, tales como aminoácidos no esenciales, suero bovino fetal y similares). A continuación, se cambia el medio por un medio normal que contiene JC-1 para permitir la incorporación de JC-1 a la célula, se cambia el medio a un medio normal que contiene una sustancia de ensayo, y se cultivan las células. A continuación, se utiliza un medio que induce la despolarización (medio normal que contiene ouabaína y KCl; en el método de ensayo de la presente invención, la ouabaína se usa a una concentración de 0,1 μM - 3 mM, y el KCl se utiliza a una concentración de 20 mM - 90 mM). La sustancia de ensayo se puede añadir junto con o después de la adición de un medio inductor de la despolarización después de la incorporación de JC-1 a la célula. Después de la adición del medio inductor de la despolarización, el tiempo de cultivo puede ser 1-24 horas. Después de eso, se miden la fluorescencia del monómero JC-1 y la fluorescencia del agregado J en un lector de placas de fluorescencia (susceptible de excitación a alrededor de 488-490 nm, que es la longitud de onda de excitación de JC-1, y capaz de la detección de la fluorescencia alrededor de 527 nm, que es la longitud de onda de pico de fluorescencia monómero JC-1 y alrededor de 590-600 nm, que es la longitud de onda de

fluorescencia del agregado J), y se calcula la proporción de la intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia del monómero/intensidad de fluorescencia del agregado J).

Los siguientes 4 tipos de pocillos se establecen en la misma placa, y la actividad se calcula como se muestra a continuación.

- 5 (1) sin tratamiento: pocillo al que se ha añadido medio normal en lugar de un medio que induce la despolarización,
 (2) control: medio libre de sustancia de ensayo,
 (3) sustancia de ensayo: pocillo al que se han añadido diversos tipos de sustancias de ensayo a cada concentración,
 (4) blanco: pocillo sin JC-1.

10 Cuando la intensidad de fluorescencia del monómero y la intensidad de fluorescencia del agregado J de los pocillos respectivos se muestran como (1) m o (1) J,

A: proporción de intensidad de fluorescencia "sin tratamiento" = $[(1)m-(4)m]/[(1)J-(4)J]$

B: proporción de intensidad de fluorescencia de "control" = $[(2)m-(4)m]/[(2)J-(4)J]$

C: proporción de intensidad de fluorescencia de la "sustancia de ensayo" = $[(3)m-(4)m]/[(3)J-(4)J]$,

15 en donde cuando B aumenta más que A y se confirma la despolarización, la actividad de apertura del canal de mitoK_{ATP} de la sustancia de ensayo se detecta basándose en el grado de disminución de C en comparación con B.

La presente invención se explica con más detalle a continuación mediante la referencia a los Ejemplos, que no se deben considerar limitantes.

Ejemplo 1

Los agentes farmacéuticos (compuestos) evaluados mediante el presente método de ensayo son los siguientes.

20 BMS-191095: sintetizado de acuerdo con J. Med. Chem., Vol. 40, 24-34 (1997) y utilizado para el experimento.

levcromakalim (GlaxoSmithKline): El compuesto 2 descrito en J. Med. Chem., Vol. 29, 2194-2201 (1986) se sintetizó y se utilizó para el experimento.

diazóxido: SIGMA D9035 se adquirió y se utilizó para el experimento.

hidrocloruro de diltiazem: SIGMA D2521 se adquirió y se utilizó para el experimento.

25 Las células Girardi suspendidas en un medio normal [(MEM (GIBCO 11095-098) con un suplemento de aminoácidos no esenciales al 1% (Disolución de Amino Ácidos No Esenciales MEM 10 mM 100X GIBCO 11140-050), y suero bovino fetal al 10% de (BIOFLUIDS DIVISION Núm. de Lote 302030))] se sembraron en una placa de color negro de fondo transparente de 96 pocillos (MATRIX MT4940) a 200 µl/pocillo y se cultivaron.

30 Se añadió JC-1 (Molecular Probes T-3168, 1 mg/ml de disolución de DMSO) a un medio normal libre de rojo de fenol [MEM (GIBCO 51200-038) con un suplemento de aminoácidos no esenciales al 1% (Disolución de Amino Ácidos No Esenciales MEM 10 mM 100X GIBCO 11140-050), L-glutamina al 1% (L-Glutamina 200 mM-100X: GIBCO 25030-149) y suero bovino fetal al 10% (Biofluids DIVISIÓN: Núm. de Lote 302030)] a 10 µl/ml, la mezcla se agitó con un mezclador de vórtice y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa (0,22 µm, MILLIPORE). Se retiró el medio en la placa de 96 pocillos y la disolución de JC-1 se dispensó a pocillo sembrado de células a 50 µl/pocillo. Se dispensó medio normal libre de rojo fenol sin JC-1 a un pocillo blanco. La placa se colocó de nuevo en una incubadora con CO₂ y se incubó durante 20 min.

A continuación, cada pocillo se lavó una vez con un medio normal libre de rojo de fenol (200 µl) y el mismo medio que contenía diversas concentraciones de cada sustancia de ensayo se dispensó a 50 µl/pocillo. Cada sustancia de ensayo se disolvió en DMSO (DimetilSulfóxido: SIGMA D-8779) a una concentración final de DMSO de 0,1%.

40 Se dispensó el medio que contenía DMSO al 0,1% a los pocillos "sin tratamiento" y de "control" a 50 µl/pocillo. La placa se colocó de nuevo en una incubadora con CO₂ y se incubó durante 25 min.

A continuación, se dispensó medio inductor de despolarización que contenía ouabaína 1 mM, KCl 60 mM, y una sustancia de ensayo a cada concentración (preparada a partir de medio normal libre de rojo fenol como base) a cada pocillo de la "sustancia de ensayo" en 50 µl. Un medio normal que contenía DMSO al 0,1% se dispensó al pocillo "sin tratamiento", y se dispensó un medio inductor de la despolarización que contenía DMSO al 0,1% al pocillo de "control" en 50 µl/pocillo.

La placa se colocó de nuevo en una incubadora con CO₂ y se incubó durante 2 hr.

Después de la inducción de la despolarización, la placa se fijó sobre un lector de placas de fluorescencia (TECAN, SpectraFluor) calentado a 37°C, y se midió la fluorescencia del agregado J a 595 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm. A continuación, se midió la fluorescencia monómero a 535 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm. La medición se realizó a una frecuencia de destello de 20 veces e intervalos de 50 microsegundos. Cada grupo contenía 4 pocillos. El valor medio de la intensidad de fluorescencia del pocillo "blanco" se restó del valor de cada pocillo "sin tratamiento", de "control" y de "sustancia de ensayo" para cada una de del fluorescencia del monómero y de la fluorescencia del agregado J, y se determinó la proporción de cada intensidad de fluorescencia, monómero/agregado J.

Los resultados se muestran en la Figura. 1 a la Fig. 4 (media \pm error estándar, n = 4).

10 Como resultado del experimento de acuerdo con el método de ensayo de la presente invención, la acción inhibitoria de la despolarización mitocondrial podría ser convenientemente evaluada para BMS-191095 (Fig. 1) y diazóxido (Fig. 2), se confirmó mediante otros métodos de ensayo que tenía una acción de apertura del canal mitoK_{ATP}.

En contraste, levcromakalim (Fig. 3), que es un abridor del canal sarck_{ATP}, y diltiazem (Fig. 4), que es un antagonista del calcio, no impidieron la despolarización mitocondrial.

15 De lo anterior, se apreciará que el método de ensayo de la presente invención puede detectar específicamente un abridor del canal mitoK_{ATP} mediante una operación conveniente en comparación con los métodos de ensayo convencionales.

Ejemplo 2

20 Se suspendieron células Girardi en un medio normal [(MEM (GIBCO 11095-098) con un suplemento de aminoácidos no esenciales al 1% (Disolución de Amino Ácidos No Esenciales MEM 10 mM 100X GIBCO 11140-050), y suero bovino fetal al 10% (BIOFLUIDS DIVISION Núm. DE e 302030))] A1 \times 10⁵ células/ml, se sembraron en una placa de color negro de fondo transparente de 96 pocillos (MATRIX MT4940) a 200 μ l/pocillo, y se cultivaron.

Para la medición del valor blanco de la fluorescencia para cada placa, no se sembraron células en parte de los pocillos.

25 Se añadió JC-1 (Molecular Probes T-3168, 1 mg/ml de disolución de DMSO) a un medio normal libre de rojo fenol [MEM (GIBCO 51200-038) con un suplemento de aminoácidos no esenciales al 1% (Disolución de Aminoácidos No Esenciales MEM 10 mM de 100X GIBCO 11140-050), L-glutamina al 1% (L-glutamina 200 mM 100X: GIBCO 25030-149) y suero bovino fetal al 10% (BIOFLIDS DIVISIÓN: Núm. de Lote 302030)] a 10 μ l/ml, la mezcla se agitó con un mezclador de vórtice y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 min y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa (0,22 μ m, Millipore). Se retiró el medio en la placa de 96 pocillos y la disolución de JC-1 se dispensó a un pocillo sembrado con células a 50 μ l/pocillo. Se dispensó medio normal libre de rojo fenol sin JC-1 a un pocillo blanco. La placa se colocó de nuevo en una incubadora con CO₂ y se incubó durante 20 min.

30 A continuación, se dispensó un medio inductor de despolarización que contenía ouabaina 1 mM, KCl 60 mM, y BMS-191095 a cada concentración (preparada a partir de medio normal libre de rojo fenol como base) al pocillo de la "sustancia de ensayo" en 100 μ L.

Se disolvió BMS-191095 en DMSO (DimetilSulfóxido: SIGMA D-8779) a una concentración final de DMSO de 0,1%.

Se dispensó un medio que contenía DMSO al 0,1% a los pocillos "sin tratamiento" y de "control" en 100 μ l/pocillo. La placa se colocó de nuevo en una incubadora con CO₂ y se incubó.

40 Después de 2 horas, la placa se fijó a un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices, SpectraMax GEMINI EM) calentado a 37°C, y se llevó a cabo la medición en condiciones de lectura inferior, Lm1 Ex: 485 nm Em: 530 nm, Lm2 Ex: 535 nm Em: 590 nm, Lectura/Pocillo: 6 veces. Cada grupo contenía 4 pocillos. El valor medio de la intensidad de fluorescencia del pocillo "blanco" se restó del valor de cada pocillo "sin tratamiento", "de control" y de "sustancia de ensayo" para cada una de la fluorescencia del monómero y la fluorescencia del agregado J, y se determinó la proporción de cada intensidad de fluorescencia, monómero/agregado J.

45 Los resultados se muestran en la Fig. 5 (media \pm error estándar, n = 4).

Aplicabilidad industrial

Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar un agente farmacéutico que actúa selectivamente sobre el canal mitoK_{ATP}. Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar convenientemente con alta precisión un agente farmacéutico que cambia el potencial de membrana mitocondrial.

50 Utilizando el método de ensayo de la presente invención, se puede evaluar en un corto período de tiempo un agente farmacéutico que cambia el potencial de membrana mitocondrial.

REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo de una sustancia, que comprende las siguientes etapas de:
 - (a) poner en contacto una célula cultivada de una línea celular humana con una sustancia de ensayo,
 - (b) poner en contacto la célula cultivada con ouabaína a una concentración de iones de potasio 20-90 mM,
 - 5 (c) medir el cambio en el potencial de membrana mitocondrial de la célula cultivada, y
 - (d) seleccionar una sustancia que cambia el potencial de membrana mitocondrial de la célula cultivada.
2. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la sustancia del apartado (d) inhibe la apoptosis de las células.
3. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la sustancia del apartado (d) inhibe el influjo de calcio a las
10 mitocondrias.
4. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la sustancia del apartado (d) actúa sobre el canal de K⁺ sensible a ATP mitocondrial.
5. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la célula cultivada deriva de corazón, cerebro, nervio, hígado o páncreas humanos.
- 15 6. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la célula cultivada es una célula Girardi.
7. El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la ouabaína tiene una concentración de 0,1 µM - 3 mM.

FIG. 1

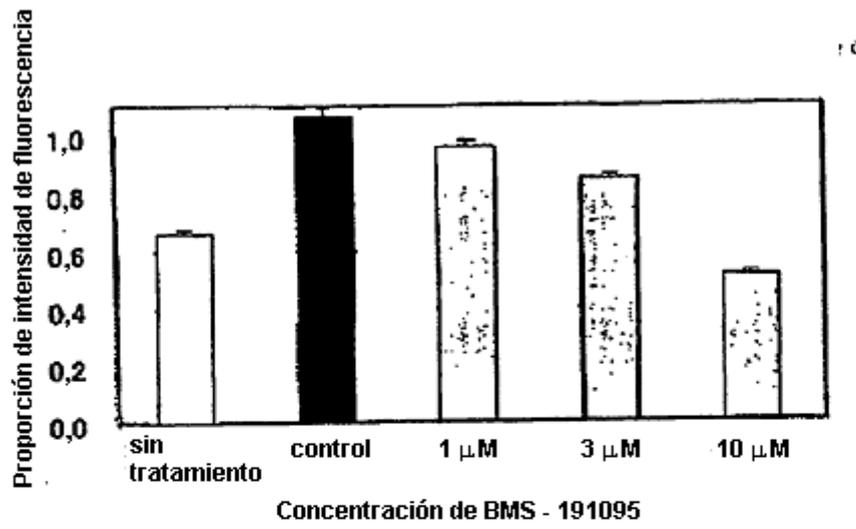
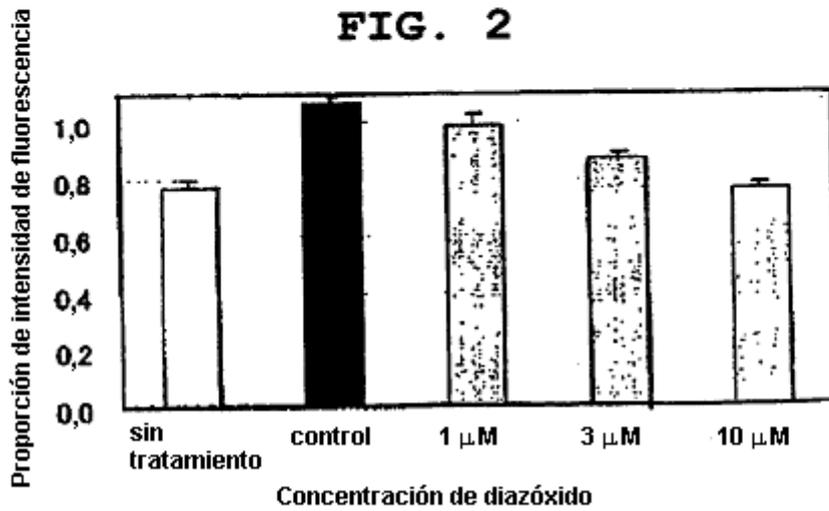


FIG. 2



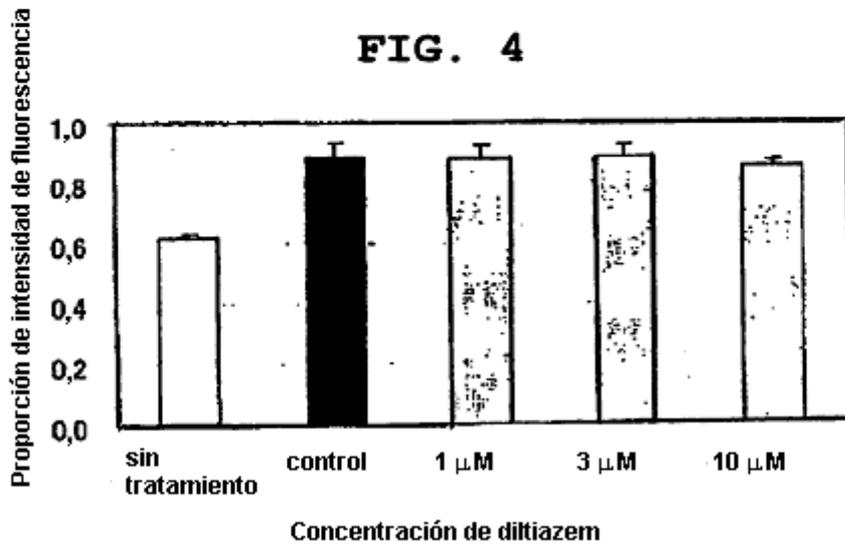
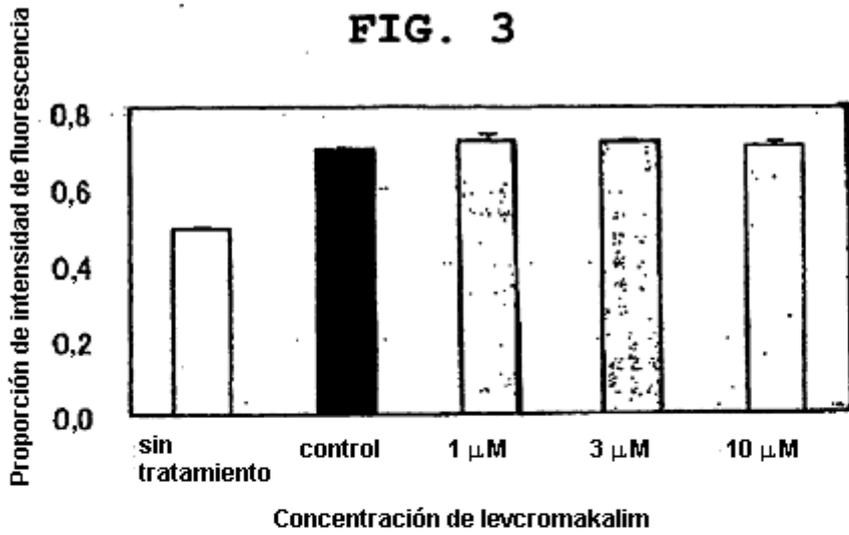


FIG. 5

