(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 284 243**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **99908097 .1**
(86) Fecha de presentación : **05.02.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1054894**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2000**

(54) Título: **Proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP) y el ADN que la codifica.**

(30) Prioridad: **05.02.1998 US 73763 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

(73) Titular/es: **University of Maryland Baltimore**
Office of Research and Development
Suite 500, 515 West Lombard Street
Baltimore, Maryland 21201-1691, US

(72) Inventor/es: **Ross, Douglas, D.;**
Doyle, L., Austin y
Abruzzo, Lynne

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP) y el ADN que la codifica.

Esta solicitud se basa en el documento de Estados Unidos Provisional 60/073763, presentado el 2/5/98.

Campo de la invención

La invención se refiere a la familia de proteínas conocida como proteínas de resistencia a múltiples fármacos. Estas proteínas son transportadores xenobióticos que confieren resistencia a fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer. La invención describe un nuevo miembro proteico de esta familia llamado Proteína de Resistencia de Cáncer de Mama (BCRP) y el ADN que la codifica.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de resistencia a múltiples fármacos quimioterapéuticos frecuentemente sucede durante el tratamiento del cáncer. Dos proteínas transportadoras xenobióticas transmembrana, P-glicoproteína (Pgp) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP) son capaces de causar resistencia a múltiples fármacos cuando se introducen por transfección en células sensibles a fármacos en cultivo (1,2). A pesar de esto, el papel que estos transportadores desempeñan en la resistencia a fármacos clínicos mostrado por cánceres humanos no está claro, y se han buscado mecanismos alternativos o adicionales de resistencia a fármacos funcionales en esta enfermedad.

Para abordar este problema, Chen *et. al*. (3) seleccionaron células MCF-7 de carcinoma de mama humano para la resistencia a la antraciclina doxorrubicina en presencia de verapamil, un inhibidor de Pgp. La sublínea resistente a múltiples fármacos resultante, MCF-7/AdrVp, muestra una marcada resistencia cruzada a otras antraciclinas (daunorrubicina [DNR], 3'-desamino-3'[3-ciano-4-morfolinil]doxorrubicina, pero no idarrubicina), y a la antracenodiona mitoxantrona, pero permanece sensible a los alcaloides de la vinca, paclitaxel (3,4) y cisplatino. Las células MCF-7/AdrVp no sobreexpresan Pgp o MRP, a pesar de presentar una reducción marcada en la acumulación intracelular de la antraciclina daunorrubicina y el colorante fluorescente rodamina 123 en comparación con las células MCF-7 (4,5). Las células MCF-7/AdrVp no presentan una alteración en la distribución subcelular del fármaco (4) tal como se observa en ciertas células que sobreexpresan MRP. Aunque la acumulación disminuida de daunorrubicina en células MCF-7/AdrVp no se invierte por el antagonista de P-glicoproteína clásico ciclosporina A, el agotamiento de ATP provoca la eliminación completa del flujo anormal tanto de daunorrubicina como de rodamina (4).

La necesidad de la técnica de dilucidar el mecanismo de resistencia a fármacos sigue existiendo, ya que la quimioterapia sigue siendo el método principal para tratar de forma no invasiva muchos tipos de cáncer. También existe la necesidad en la técnica de contrarrestar el mecanismo de resistencia a fármacos para proporcionar de este modo un transcurso más largo y más eficaz de tratamiento con fármaco quimioterapéutico para pacientes con cáncer.

Sumario de la invención

El descubrimiento descrito en la presente invención cumple las necesidades anteriores. El descubrimiento de la BCRP y su gen correspondiente avanza enormemente el conocimiento en la técnica sobre el mecanismo de resistencia a fármacos proporcionando un nuevo transportador xenobiótico que está sobreexpresado en una diversidad de líneas celulares de cáncer humano resistentes a fármacos, y confiere resistencia a muchos agentes quimioterapéuticos.

BCRP es una proteína de aproximadamente 655 aminoácidos y está codificada por un gen que tiene un ADNc de aproximadamente 2418 nucleótidos. La proteína muestra actividad y tiene una homología de secuencia que la coloca en la superfamilia del casete de unión a ATP (ABC) de proteínas transportadoras. La masa molecular es de aproximadamente 72,3 kilodalton (kD) exclusiva de cualquier glicosilación. La expresión de BCRP en células de cáncer humano sensibles a fármacos confiere resistencia a mitoxantrona, doxorrubicina, y daunorrubicina, y reduce la acumulación de daunorrubicina en las células transfectadas clonadas.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de mamífero que sea una proteína resistente a múltiples fármacos (MDR) y un transportador xenobiótico, y se llama proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP).

También es un objeto de la presente invención proporcionar el gen y/o el ADNc que codifica dicha proteína MDR de mamífero.

Otro objeto de la invención es proporcionar fragmentos antisentido del gen de BCRP que inhiba la expresión de la BCRP *in vivo*.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método para usar sondas derivadas del gen de BCRP como una herramienta de diagnóstico para cuantificar la expresión génica o amplificación génica en muestras tomadas de pacientes con cáncer.

Otro objeto de la invención es proporcionar anticuerpos contra la BCRP.

Otro objeto más de la invención es proporcionar un método para invertir la resistencia a fármacos de las células cancerosas administrando anticuerpos contra BCRP.

Otro objeto más de la invención es proporcionar un método para invertir la resistencia a fármacos de las células cancerosas administrando Fumitremorgina C.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para potenciar un tratamiento de quimioterapia del paciente para cáncer de mama administrando anticuerpos al paciente para inhibir la actividad de resistencia de BCRP.

Estos y otros objetos de la invención, que serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención proporcionada a continuación en este documento, se han cumplido, en una realización, por BCRP sustancialmente pura y el gen que codifica BCRP.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una autorradiografía de las huellas genéticas de ARN de células MCF-7.

La Figura 1B es una autorradiografía de una hibridación de transferencia de Northern de ARNm de células MCF-7/W, MCF-7/AdrVp, y MCF-7/AdrVpPR.

La Figura 1C es una autorradiografía de una hibridación de transferencia de Southern genómica de ADN de células MCF-7/AdrVp, MCF-7/W y MCF-7/AdrVpPR.

La Figura 2A es la secuencia de aminoácidos deducida de BCRP con motivos.

La Figura 2B muestra la similitud relativa de BCRP con miembros seleccionados de la superfamilia de transportadores ABC.

La Figura 2C es la secuencia de ADNc que codifica la BCRP.

La Figura 2D es un gráfico de un filograma que muestra la evolución de la secuencia de aminoácidos de BCRP en relación con ciertos miembros diferentes de la familia ABC de proteínas transportadoras.

La Figura 3 muestra una autorradiografía de una transferencia de Northern de múltiples tejidos.

La Figura 4A es una autorradiografía de una transferencia de Northern de subclones de transfectantes BCRP.

La Figura 4B es un gráfico de la acumulación y la retención de Daunorrubicina (DNR) en las células de control del vector pcDNA3 y los clones 6 y 8 transfectados con BCRP.

La Figura 4C muestra los factores de resistencia relativa-MCF-7, los controles de vector, los clones 19, 6, y 8.

La Figura 4D son gráficos que muestran el efecto de diversas concentraciones de fármacos quimioterapéuticos sobre la supervivencia de células del clon 8 de MCF-7 transfectadas con BCRP.

La Figura 4E muestra un gráfico de los efectos del agotamiento de ATP de la retención de rodamina 123 por células MCF-7 transfectantes/pcDNA3 (control de vector vacío) o MCF-7/BCRP clon 8.

La Figura 5 es una tabla que muestra el efecto de diversos fármacos quimioterapéuticos sobre células MCF-7 transfectadas con BCRP.

La Figura 6 es una autorradiografía que muestra la expresión del gen ω Humano en células MCF-7 detectadas por la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

La Figura 7 es una autorradiografía que muestra la expresión de BCRP en muestras de células blásticas de pacientes con leucemia mielogénica aguda.

Las Figuras 8A, 8B y 8C son autorradiografías que muestran los resultados de hibridaciones de transferencia de Northern de ARNm de diversas líneas celulares resistentes a fármacos sondeadas con una sonda de BCRP.

La Figura 9 es una autorradiografía de una hibridación de transferencia de Southern de diversas líneas celulares MCF-7.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de la administración de FTC a células transfectadas con BCRP.

Descripción detallada de la invención

Se describe un nuevo gen y la proteína codificada por dicho gen, llamada la Proteína asociada a Resistencia de Cáncer de Mama (BCRP) en la presente invención. Se muestra que la BCRP se sobreexpresa en células humanos de carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma gástrico, fibrosarcoma, y origen de mieloma resistentes a múltiples fármacos (MDR). La BCRP es un transportador xenobiótico que confiere resistencia a múltiples fármacos quimioterapéuticos, y pertenece a la superfamilia de transportadores ABC. La BCRP parece ser responsable de la alteración en el transporte de fármacos y la resistencia a fármacos manifestada por diversas células cancerosas.

La presente invención pertenece parcialmente a la BCRP, a fragmentos de este factor, así como derivados funcionales, agonistas y antagonistas, y productos de descomposición metabólica de este factor. La secuencia de aminoácidos de BCRP se representa en la SEC ID Nº 1 y la Figura 2A. La invención se refiere especialmente a agentes que son capaces de inhibir BCRP, preferiblemente anticuerpos contra BCRP o sondas antisentido para el gen de BCRP. La invención abarca adicionalmente agentes químicos que inhiben la expresión del gen o ARNm de BCRP, incluyendo Fumitremorgina C (FTC). La invención también se refiere a métodos para inhibir la actividad de BCRP o la expresión del gen de BCRP administrando dichos agentes.

Un "derivado funcional" de BCRP es un compuesto que tiene una actividad biológica (funcional o estructural) que es sustancialmente similar a una actividad biológica de BCRP. La expresión "derivados funcionales" pretende incluir los "fragmentos", "variantes", "análogos", o "derivados químicos" de una molécula. Se entiende que un "fragmento" de una molécula tal como BCRP, se refiere a cualquier subconjunto polipeptídico de la molécula. Un fragmento funcional significa una molécula con una secuencia de aminoácidos similar, pero no idéntica, pero que tiene la misma función de la BCRP de longitud completa. Se entiende que una "variante" de una molécula tal como BCRP se refiere a una molécula sustancialmente similar en estructura y función a la molécula completa, o a un fragmento de la misma. Se dice que una molécula es "sustancialmente similar" a otra molécula si ambas moléculas tienen estructuras sustancialmente similares o si ambas moléculas tienen una actividad biológica similar.

Por tanto, con la condición de que dos moléculas tengan una actividad similar, se consideran variantes ya que este término se usa en este documento incluso si la estructura de una de las moléculas no se encuentra en la otra, o si la secuencia de restos aminoacídicos no es idéntica. Se entiende que un "análogo" o agente que imita la función de una molécula tal como BCRP se refiere a una molécula sustancialmente similar en función pero no en estructura a la molécula completa o a un fragmento de la misma. Como se usa en este documento, se dice que una molécula es un "derivado químico" de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no son parte de la molécula. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, etc. de la molécula. Los restos pueden disminuir alternativamente la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar dichos efectos se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980). Se conocen bien en la técnica procedimientos para acoplar dichos restos a una molécula.

Un "antagonista" de BCRP es un compuesto que inhibe la función de BCRP. Dichos antagonistas pueden ser inmunoglobulinas (tales como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal, o fragmentos activos de dicho anticuerpo). Los antagonistas o inhibidores de acuerdo con la presente invención que son útiles para inhibir el efecto de resistencia a fármacos causado por BCRP son un anticuerpo producido contra la BCRP o el fármaco fumitremorgina C (FTC), una micotoxina. Se obtuvo FTC del Dr. Lee Greenberg en Wyeth-Ayrest Laboratories en Pearl River, Nueva York.

Puede prepararse un anticuerpo policlonal capaz de unirse a BCRP inmunizando un animal con una preparación de BCRP o derivado funcional de BCRP. Los métodos para conseguir dichas inmunizaciones son bien conocidos en la técnica. También pueden emplearse anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos para ensayar la presencia o cantidad de BCRP en una muestra biológica particular. Dichos anticuerpos pueden producirse inmunizando esplenocitos con BCRP activada (7). Los anticuerpos de unión a BCRP de la presente invención pueden administrarse a pacientes para reducir la resistencia a fármacos quimioterapéuticos, y por tanto para potenciar su tratamiento. Los métodos de administración dependerán de las circunstancias particulares de cada paciente individual y pertenecen a las capacidades de los especialistas en la técnica.

La BCRP de la presente invención puede obtenerse por procesos naturales (tales como, por ejemplo, induciendo la producción de BCRP de una célula humana o animal); por métodos sintéticos (tales como, por ejemplo, usando el método de Merrifield sintetizando polipéptidos para sintetizar BCRP, derivados funcionales de BCRP, o agonistas o antagonistas de BCRP (inmunoglobulina o no inmunoglobulina); o por la aplicación de tecnología recombinante (tal como, por ejemplo, para producir la BCRP de la presente invención en diversos hospedadores, por ejemplo, levaduras, bacterias, hongos, células de mamífero cultivadas, por nombrar algunos, o de plásmidos recombinantes o vectores virales). Se dice que los compuestos de la presente invención están "sustancialmente libres de contaminantes naturales" si las preparaciones que los contienen están sustancialmente libres de materiales con los que estos productos se encuentran de forma normal y natural.

La elección del método a emplear dependerá de factores tales como la conveniencia, rendimiento deseado, etc. No es necesario emplear sólo uno de los métodos, procesos, o tecnologías descritos anteriormente para producir BCRP; los procesos, métodos y tecnologías descritos anteriormente pueden combinarse para obtener BCRP. Es más preferible

preparar BCRP expresando el gen o secuencia de ADNc que codifica la proteína BCRP. Dicho gen o secuencia de ADNc se llamará a partir de ahora el "gen de BCRP" o "secuencia de ADNc de BCRP".

Se empleó la técnica de huella genética de ARN para clonar el ADNc de BCRP. La formación de huellas genéticas de ARN usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pares de cebadores degenerados para amplificar el ARNm celular. Esta técnica se basa en modificaciones de la técnica de "Presentación Diferencial de ARNm" desarrollada por Liang y Pardee (6). Se usaron estas técnicas como un medio para descubrir genes que se expresan de forma diferencial en líneas celulares seleccionadas por fármacos en comparación con células parentales. La diferencia principal entre la Huella Genética de ARN y la Presentación Diferencial es que el protocolo de huella genética de ARNm usa una única reacción de síntesis de ADNc, seguida por amplificación con cebadores cadena arriba y cadena abajo. La Presentación Diferencial usa de 9 a 12 síntesis de ADNc para cada muestra de ARN con un cebador oligo(dT) anclado, seguido por la amplificación con un cebador cadena arriba.

El gen de BCRP clonado, obtenido a través de los métodos descritos anteriormente y en los ejemplos, puede unirse de forma operativa a un vector de expresión, e introducirse en células bacterianas, o eucariotas para producir la proteína BCRP. Las técnicas para dichas manipulaciones se describen en Maniatis, T. *et al. supra*, y son bien conocidas en la técnica (8).

La secuencia de ADNc de BCRP es de aproximadamente 2418 nucleótidos de longitud. El ADNc de BCRP se representa en la SEC ID Nº 2 o Figura 2C. El ADNc de BCRP puede usarse para expresar la BCRP. Además, la secuencia de ADNc de BCRP, o una parte de la misma, puede usarse como sonda en un ensayo de transferencia de Northern o para la selección de sondas en un ensayo de RT-PCR para medir el ARNm de BCRP en diversas muestras tisulares. La medición de la expresión de BCRP por transferencia de Northern o ensayo de RT-PCR puede ser determinante de la respuesta al fármaco para fármacos quimioterapéuticos en el tiempo. Las técnicas para estos ensayos se describen en los ejemplos y son bien conocidas en la técnica (8). Por lo tanto, dicho ensayo podría usarse para determinar si el fallo de un paciente para responder a la quimioterapia se debe a la sobreexpresión de BCRP, y por tanto la resistencia a los fármacos. Además, podrían desarrollarse sondas antisentido basadas en la secuencia de ADNc representada en la SEC ID Nº 2 y la Figura 2C. Estas sondas pueden administrarse a pacientes para que se unan al ADNc de BCRP de forma endógena y por tanto para inhibir la expresión de la BCRP. Dicha terapia podría usarse para detener o ralentizar la propensión del paciente a llegar a ser resistente a los fármacos quimioterapéuticos y por tanto hacer al tratamiento más eficaz. Las técnicas para la producción y administración de sondas antisentido son bien conocidas en la técnica. Las técnicas de hibridación de ácido nucleico y clonación son bien conocidas en la técnica (8).

Los datos presentados en los ejemplos y las figuras correspondientes apoyan enormemente la conclusión de que el nuevo miembro BCRP de la familia ABC presentado en este documento es un transportador xenobiótico que es principalmente responsable del fenotipo resistente a fármacos de células MCF-7/AdrVp.

En la presente invención también se muestra la sobreexpresión de BCRP en varias líneas celulares cancerosas. Estas líneas celulares incluyen células de carcinoma de colon S1, HT29, células de carcinoma gástrico EPG85-257, células de fibrosarcoma EPR86-079, y células de mieloma 8226. La sobreexpresión del ARNm de BCRP en cada una de estas líneas celulares, y la amplificación del gen de BCRP en las células resistentes a fármacos demuestran un importante papel de BCRP en la resistencia a agentes citotóxicos. Además, la sobreexpresión impuesta de BCRP en células MCF-7 disminuyó la acumulación celular de daunorrubicina y confirió un patrón de resistencia cruzada a fármacos a las células transfectadas que era casi idéntico al de las células MCF-7/AdrVp. El grado de sobreexpresión de BCRP en los clones transfectantes 6 y 8 se correlaciona con las alteraciones en el nivel de estado estacionario intracelular de daunorrubicina y su grado de resistencia a mitoxantrona, daunorrubicina y doxorrubicina.

Una diferencia principal entre los clones transfectantes que sobreexpresan BCRP y la sublínea MCF-7/AdrVp original es que el grado de resistencia a fármacos en la última es mayor que en las células transfectadas, mientras que los niveles de ARNm de BCRP en estado estacionario en cada una son comparables (Figura 4A). Varias posibilidades pueden contribuir a esta diferencia. Las diferencias en la estabilidad proteica y/o localización pueden contribuir al fenotipo resistente a fármacos completo, o puede requerirse la expresión de otras proteínas. Recientemente, se informó de que miembros de la familia de antígenos carcinoembrionarios (CEA), principalmente el antígeno de reacción cruzada no específica (NCA) y el propio CEA, están marcadamente sobreexpresados en la superficie celular de células MCF-7/AdrVp y MCF-7/AdrVpPR en comparación con células MCF-7 sensibles a fármacos (15). Una elevada densidad de estas glicoproteínas ácidas en la superficie celular puede protonar fármacos tales como mitoxantrona, daunorrubicina o doxorrubicina que evita la entrada en la célula. De hecho, Kawaharata, *et. al*. (16) informaron de que la expresión impuesta de CEA en células NIH3T3 transfectadas provoca tanto la acumulación disminuida como la resistencia a doxorrubicina en las células transfectadas. Por tanto, la sobreexpresión relativa de los miembros de la familia de CEA en la superficie de células MCF-7/AdrVp podría funcionar junto con BCRP para causar mayor resistencia a mitoxantrona, doxorrubicina y daunorrubicina que la causada por BCRP sola. Esta hipótesis podría ensayarse co-transfectando la sublínea MCF-7/BCRP-clon 8 con un vector de expresión que contenga NCA o CEA.

Otra posible explicación para el mayor grado de resistencia de células MCF-7/AdrVp en comparación con los transfectantes es que BCRP es parte de un complejo transportador multiproteico. La vía de translocación de transportadores ABC típicos está compuesta de dos dominios de unión a ATP y dos dominios altamente hidrófobos que contienen regiones de membrana. Esto puede conseguirse en una única molécula, como es el caso de MRP o Pgp, que

son dos veces el tamaño de BCRP (aproximadamente 1.300 en comparación con 655 aminoácidos). Como alternativa, el complejo activo de ciertos transportadores ABC puede formarse por la heterodimerización de dos proteínas no idénticas, cada una de las cuales contiene una única región de unión a ATP e hidrófoba. Las proteínas ω y marrón (b) de Drosophila y las proteínas Tap-1 y Tap-2 que transportan proteínas de clase I de histocompatibilidad principal son ejemplos de miembros de la familia ABC que muestran dicha interacción cooperativa. La presencia del sitio de unión de fosfopanteteína en BCRP sugiere que BCRP puede ser parte de un complejo multiproteico. Por tanto, es posible que BCRP tenga un cofactor o cofactores proteicos que hagan de ella un transportador mucho más eficaz en un estado heteromérico. La activación o sobreexpresión de este cofactor en células MCF-7/AdrVp con relación a células MCF-7 podría explicar el transporte aumentado de fármacos en la sublínea MCF-7/AdrVp con relación a los transfectantes de BCRP.

El descubrimiento de la expresión elevada de ARNm de BCRP en las células S1M1-3.2 de carcinoma de colon humano sugiere que BCRP es el transportador de fármacos "no Pgp, no MRP" manifestado por esta línea celular resistente a múltiples fármacos. Esto es de particular importancia a causa del reciente informe (25) de un inhibidor específico del transportador identificado en células S1M1-3.2. Este inhibidor, fumitremorgina C (FTC), no invierte la resistencia en células que sobreexpresan Pgp o MRP. La Figura 10 muestra que FTC es capaz de potenciar la acumulación e inhibir el flujo de BBR 3390 (un fármaco aza-antrapirazol que es evacua por BCRP) en células MCF-7 transfectadas con BCRP.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para propósitos ilustrativos y de ningún modo pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Líneas celulares. Las células de carcinoma de mama MCF-7, su sublínea resistente a fármacos MCF-7/AdrVp, y una sublínea de reversión parcialmente sensible a fármacos (MCF-7/AdrVpPR, obtenida del Dr. Antonio Fojo, Medicine Branch, National Cancer Institute), se mantuvieron en cultivo como se ha descrito previamente (5). La sublínea MCF-7/AdrVp se mantuvo de forma continua en presencia de 100 ng/ml de doxorrubicina (Pharmacia Adria, Dublin, OH) y 5 μg/ml de verapamil (Sigma Chemicals, St. Louis, MO).

Las condiciones de crecimiento para las líneas celulares usadas en los estudios de transferencia de Northern están contenidas en las referencias enumeradas en la Tabla 1. Las células de carcinoma de colon S1M1-3.2 se obtuvieron de células S1 (un subclón de la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T) por selección para el crecimiento a concentraciones crecientes de mitoxantrona hasta que se consiguió una concentración final de 3,2 μM. Se adquirieron células HL-60/MX2 de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvieron en cultivo como se ha descrito previamente (17).

Ejemplo 1

Síntesis de ADNc por transcripción inversa de ARNm

Se transcribió de forma inversa el ARN celular total purificado (2 μg) de células MCF-7/W, MCF-7/AdrVp o MCF-7/AdrVpPR que se habían invertido parcialmente a la sensibilidad a fármacos por cultivo en ausencia de agentes de selección con 200 unidades de transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina de Moloney en presencia de un cebador oligo(dT) (0,1 μM), y dNTP 1 mM a 42ºC durante 1 hora. Las reacciones se terminaron calentando a 75ºC durante 10 minutos. Los ADNc producidos de este modo se almacenaron a -20ºC hasta su uso adicional.

Ejemplo 2

Formación de huellas genéticas de ARN

Las huellas genéticas de ARN se realizaron usando el kit de huellas genéticas de ARN Delta™ (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) con modificaciones minoritarias. Las huellas genéticas de ARN se consiguen por amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores aleatorios.

Para cada reacción de huellas genéticas, se amplificó ADNc diluido 1:10 (dilución A) o 1:40 (dilución B) de cada línea celular con un cebador cadena arriba (P) y uno cadena abajo (T) en presencia de dNTP 50 μM, [^{33}P]dATP 50 nM, y la "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" suministrada con el kit de Clontech. Los cebadores P cadena arriba eran de 25 unidades arbitrarias. Los cebadores T cadena abajo eran cebadores oligo(dT) anclados de 30 unidades cuyo extremo 3' contenía la secuencia 5'-$T_9N_1N_1$-3', en la que N_1 es A, C o G. El cebador P se une al ADNc en base a la homología casual. Se emparejaron diez cebadores P y nueve cebadores T para dar 90 posibles combinaciones.

Los primeros tres ciclos de PCR se realizaron a una rigurosidad relativamente baja (temperatura de hibridación 40ºC). A causa de esto, el cebador P se unió de forma imperfecta, que aumentó la cantidad de productos amplificados. Los productos de estos primeros ciclos después se amplificaron por 24 ciclos de PCR a elevada rigurosidad (temperatura de hibridación 60ºC). Se prepararon reacciones de control de PCR que contenían agua estéril en lugar de ADNc (control de agua), o 0,02 μg de ARN celular total (control de ARN). Los controles de ARN se prepararon para evaluar si el ARN estaba contaminado con ADN genómico.

Después de la reacción de PCR, se cargó una pequeña cantidad de cada mezcla de reacción en un gel de poliacrilamida al 5%, después de lo cual se secaron los geles, después se hicieron autorradiografías (Figura 1A). Estas autorradiografías demostraron un patrón de "huella genética de ARN" característico de 50 a 100 bandas del producto de PCR de 100 a 2000 nucleótidos de longitud. Los carriles 1, 3, y 5 eran mezclas de reacción en las que se había añadido ADNc diluido 1:10 (dilución A); los carriles 2, 4, y 6 representan mezclas de reacción en las que se había añadido ADNc diluido 1:40 (dilución B). Los carriles 7 y 8 son "controles de H_2O", en los que se había añadido agua estéril a la mezcla de reacción de PCR en lugar de ADNc. Los carriles 9, 10 y 11 son "controles de ARN", en los que se añade 0,02 μg de ARN celular de MCF-7/W, MCF-7/AdrVp, o MCF-7/AdrVpPR en lugar de ADNc. Estos "controles de ARN" sirven para indicar la contaminación del ARN con ADN genómico. Las autorradiografías se inspeccionaron para los productos de PCR que se produjeron en mayor abundancia en reacciones que usaron ARN transcrito de forma inversa de células MCF-7/AdrVp, en comparación con los del ARN usado de las células MCF-7/W o MCF-7/AdrVpPR (Figura 1A). La FLECHA indica un producto de PCR que representa una especie de ARNm que se sobreexpresa en células MCF-7/AdrVp, en comparación con las células MCF-7/W o MCF-7/AdrVpPR. Este es el producto de PCR que se cortó del gel y se amplificó y clonó usando el método de "Clonación TA", cuyo clon deseado se llamó Clon 8 (véase a continuación).

Ejemplo 3

Amplificación del ADNc diana por clonación TA

El producto de PCR sobreexpresado en células MCF-7/AdrVp se escindió del gel secado y se eluyó hirviendo en 40 ml de ddH_2O durante 5 minutos, después se amplificó por PCR durante 20 ciclos usando los cebadores originales y se separó en geles de agarosa al 2%/bromuro de etidio. Estos productos de PCR después se ligaron en un plásmido "Vector de Clonación TA", pCR® 2.1, que después se clonó usando técnicas convencionales para productos de PCR (Kit TA Cloning® Original, Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

Los plásmidos pCR®2.1 que contienen el producto de PCR se usaron para transformar la cepa TOP 10F de *E. coli*. Se cogieron colonias bacterianas individuales y se aisló el ADN plasmídico por minipreparaciones (Wizard™ Miniprep, Promega, Madison, WI). Se amplificó el ADN plasmídico por PCR con los cebadores "P" y "T" originales, después se sometieron a electroforesis en gel. La banda de tamaño original se cortó, y se aisló el ADN hirviendo en 100 μl de ddH_2O a 100ºC durante 5 minutos. Se volvió a amplificar una alícuota del ADN por PCR con los cebadores originales durante 20 ciclos. Se visualizó una única banda en geles con bromuro de etidio que se cortó, electroeluyó y después se precipitó.

Ejemplo 4

Aislamiento del clon de BCRP

Se usó el método de transferencia de Northern "inverso" para explorar los clones del vector TA. En resumen, se realizó un análisis de Northern "inverso" del siguiente modo. El producto de PCR aislado de 12 diferentes colonias de *E. coli* que estaban transformadas por el plásmido pCR2.1 se fijó por duplicado a membranas Zeta Probe (BioRad, Richmond, CA) en un aparato de slot blot. Una de las membranas duplicadas se sondeó con la mezcla de reacción de PCR marcada con [^{33}P] que amplificó el ADNc de MCF-7 usando los cebadores "P" y "T" originales en el kit de Huella genética de ARN. La otra membrana se sondeó con la mezcla de reacción de PCR paralela marcada con [^{33}P] original que amplificó el ADNc producido por células MCF-7/AdrVp, usando condiciones de transferencia de Northern convencionales de hibridación, después de lo cual se evaluó la unión de la sonda por autorradiografía. Un único clon TA (Clon 8 - SEC ID Nº 7) se identificó de este modo cuyo inserto de producto de PCR identificaba una especie de ARN de 2,4 kb que estaba marcadamente sobreexpresada en células MCF-7/AdrVp, en comparación con células MCF-7 (Figura 1B, panel superior). La sublínea MCF-7/AdrVpPR de reversión parcial tenía una expresión intermedia de la especie de ARNm de 2,4 kb (Figura 1B, panel superior). Para controlar la equivalencia en la carga de los carriles, se separa la transferencia y después se vuelve a sondear con ARN 18S radiomarcado (Figura 1B, panel inferior).

Se realizaron transferencias de Southern usando el producto de PCR del Clon 8. En resumen, se aisló el ADN, se digirió con *Eco*R1, se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se transfirió y fijó a un filtro de nitrocelulosa. El filtro se sondeó con el producto de PCR de Clon 8 que se marcó en el extremo con [^{32}P]-dCTP, después se hizo la autorradiografía mostrada (Figura 1C, panel superior). Esto demostró que el gen afín para BCRP se amplificaba en células tanto MCF-7/AdrVp como MCF-7/AdrVpPR, en comparación con las células MCF-7 parentales (Figura 1C, panel superior). El panel inferior de la Figura 1C muestra el electroforetograma del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio del ADN genómico correspondiente después de la digestión con *Eco*R1, para demostrar la equivalencia aproximada de la carga del gel.

Ejemplo 5

Secuenciación del clon de BCRP

Se realizó la secuenciación de los ADNc con un secuenciador de ADN automático (Perkin Elmer, Inc., Foster City, CA). Todas las secuencias de ADN se confirmaron secuenciando en la dirección inversa. El producto de PCR

expresado de forma diferencial en el Clon 8 TA se secuenció y se descubrió que era un ADNc de 795 pb (SEC ID Nº 7). Las búsquedas en bases de datos de proteínas de la secuencia de aminoácidos deducida reveló un elevado grado de homología con miembros de la superfamilia ABC de proteínas transportadoras.

Ejemplo 6

Aislamiento del ADN de BCRP de longitud completa

Se construyó una biblioteca de ADNc de MCF-7/AdrVp usando el kit de construcción de bibliotecas de ANDc por PCR CapFinder™ (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La técnica de CapFinder™ está diseñada específicamente para producir ADNc bicatenario de longitud completa. El fragmento de ADNc del Clon 8 de 795 pb se radiomarcó y usó como sonda para explorar la biblioteca de ADNc preparada a partir de células MCF-7/AdrVp. Los clones positivos aislados se sometieron a exploración secundaria y terciaria, después se ensayaron por hibridación por transferencia de Northern usando ARN obtenido de células MCF-7, MCF-7/AdrVp y MCF-7/AdrVpPR. Se encontraron múltiples clones que tenían insertos de 2,4 kb, el tamaño aproximadamente del ARNm de BCRP sugerido por transferencia de Northern.

Se ligaron cuatro de los insertos de 2,4 kb en el plásmido pCR2.1, después se clonaron estos vectores TA en *E. coli* (como se ha descrito anteriormente). Un clon del vector TA que contenía un inserto del fragmento de ADNc de 2,4 kb se identificó y aisló. La secuenciación del inserto de ADNc de 2,4 kb se realizó con un secuenciador de ADN automático (Perkin Elmer Inc., Foster City, CA). Todas las secuencias de ADN se confirmaron por secuenciación en la dirección inversa. Después de secuenciar, se descubrió que el inserto de ADNc era de 2418 pb de longitud como en la Figura 2C o la SEC ID Nº 2. El análisis del ADNc para las fases de lectura abierta (ORF) usando el programa "FRAMES" contenido en el paquete de software Genetics Computer Group (GCG) indicó la presencia de una ORF larga que comenzaba en la posición 239, y finalizaba con el codón de parada TAA en la posición 2204-6. La secuencia de aminoácidos deducida de esta ORF se muestra en la Figura 2A, y la SEC ID Nº 1. La proteína tiene 655 aminoácidos y un peso molecular aproximado de aproximadamente 72,3 kilodalton. La proteína codificada por esta secuencia se ha denominado Proteína de Resistencia de Cáncer de Mama, o BCRP (Figura 2A).

El análisis de la secuencia de BCRP con el programa de GCG "MOTIFS" demostró una única región de unión a ATP/GTP (11) Walker "A" en los aminoácidos 80-87 y un sitio de unión a fosfopanteteína en los aminoácidos 213-228 (Figura 2A). La fosfopanteteína (o panteteína 4' fosfato) es el grupo prostético de las proteínas de vehículo de acilo en algunos complejos multienzimáticos donde sirven para la unión de ácidos grasos activados y grupos aminoácido (12).

El examen de la estructura de BCRP con los programas de GCG "PEPPLOT" y "PLOTSTRUCTURE" reveló un dominio amino-terminal relativamente hidrófilo (aminoácidos 1-400) que contiene la secuencia de unión a ATP y un dominio carboxi-terminal relativamente hidrófobo (aminoácidos 401-655), que contiene al menos tres dominios transmembrana putativos (TM1, TM2 y TM3), y cuatro sitios de N-glicosilación potenciales (Glyc) (Figura 2A). Los dominios transmembrana se estimaron por el uso de un programa para predecir hélices en proteínas de membrana integradas (13). El análisis de la secuencia de BCRP por el programa de GCG "DOTPLOT" demuestra que el péptido es homólogo con la mitad de la molécula Pgp o MRP duplicada, excepto que Pgp o MRP tienen la configuración NH_2-[dominios transmembrana]-[unión a ATP 1]-[dominios transmembrana]-[unión a ATP 2]-COOH, mientras que la de BCRP es NH_2-[unión a ATP]-[dominios transmembrana]-COOH. La similitud relativa de BCRP con otros miembros de la superfamilia de transportadores ABC se determinó usando el programa "PILEUP" de GCG. Este análisis demostró que la secuencia peptídica de BCRP está relacionada sólo de forma distante con la P-glicoproteína (PgP o Mdr1) o MRP (Figura 2B).

Ejemplo 7

Comparación de la secuencia de BCRP con la secuencia de ω

Se consiguieron análisis de ADNc y secuencias proteicas deducidas usando bases de datos de proteínas y nucleótidos a las que se accedieron usando el Wisconsin Sequence Analysis Package Versión 8 (Genetics Computer Group [GCG], Madison, WI] que están disponibles a través de la Frederick Cancer Research Center's Supercomputing Facility (Frederick, MD).

Una comparación "FASTA" de la secuencia de aminoácidos de BCRP reveló un elevado grado de homología con al menos 50 proteínas de transporte de casete de unión a ATP. La mayor coincidencia fue PIR2:G02068, el homólogo humano del gen blanco (*ω*) de *Drosophila*, que tiene 638 aminoácidos, y es un 29,3% idéntico a BCRP. El gen *ω* en *Drosophila* funciona en el transporte celular de guanina y triptófano, que son precursores del pigmento de la retina (9). Se descubrió que el homólogo humano de *ω* no se sobreexpresa en células MCF-7/AdrVp en comparación con células MCF-7, como se detecta por un ensayo de PCR de transcripción inversa (Figura 6).

El programa "Oligo" (Versión 5.0, National Biosciences, Inc., Plymouth, MN) se usó para ayudar a determinar los cebadores adecuados para la detección del homólogo humano de *ω* por PCR de transcripción inversa. Estos ensayos se hicieron usando una modificación de los descritos previamente para la beta actina y MRP (10), excepto en que se usaron cebadores específicos para el gen *ω* en lugar de MRP. El cebador superior comienza en la posición 5' 2136 del ARNm de *ω* humano, y tenía la secuencia 5'-CGA CCG ACG ACA CAG A-3) (SEC ID Nº 3). El cebador inferior

comienza en la posición 3' 2590, y tenía la secuencia 5'-CTT AAA ATG AAT GCG ATT GAT-3') (SEC ID Nº 4). Para asegurar la uniformidad de la carga del gel, también se realizó un ensayo de PCR de transcripción inversa para la beta actina. Las concentraciones finales de los cebadores usados fueron 200 nM. Se realizaron veinticinco ciclos de desnaturalización (94ºC, 1 minuto), hibridación (50ºC, 1 minuto) y elongación (72ºC, 2 minutos). La Figura 6 muestra una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de las mezclas de reacción de PCR que usaron ARN de células MCF-7 o MCF-7/AdrVp que demuestra que tanto ω como la beta actina humanas se expresan de forma aproximadamente igual en estas líneas celulares.

Ejemplo 8

Transferencias de Northern de diversos tejidos humanos con una sonda de BCRP (Clon 8)

Se realizó transferencia de Northern con una sonda de ADNc del Clon 8 marcado con ^{32}P. El ARN sometido a electroforesis en gel de agarosa pretransferido de múltiples tejidos se adquirió de Clontech, para su uso en múltiples ensayos de transferencia de Northern tisular. (Figura 3). La mayor expresión de BCRP se observó en tejido placentario, con cantidades inferiores de expresión demostrable en cerebro, próstata, intestino delgado, testículo, ovario, colon e hígado. Los transcritos de BCRP estuvieron por debajo del nivel de detección en el corazón, pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo y leucocitos de sangre periférica.

Ejemplo 9

Expresión de BCRP en células MCF-7 - Estudios Funcionales

Se insertó el ADNc de BCRP de longitud completa en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen). Después de la subclonación de la construcción de pcDNA3-BCRP, se realizó un análisis de secuencia de ADN para confirmar que el inserto en el clon que se eligió que estaba en una orientación con sentido respecto al promotor CMV del vector pcDNA3. Se transfectaron células MCF-7 con pcDNA3-BCRP, usando el método de precipitación con fosfato cálcico (17), seleccionadas por cultivo con geneticina (G418, 1 mg/ml), después de subclonaron por dilución limitante en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos. Los subclones se ensayaron para la expresión de ARNm de BCRP por análisis de transferencia de Northern, usando el ADNc del Clon 8 radiomarcado como sonda (Figura 4A). Como control, también se transfectaron células MCF-7 con el vector pcDNA3 vacío, después se seleccionaron por crecimiento en medio que contenía 1 mg/ml de G418 (Figura 4A). Se seleccionaron dos clones de células MCF-7 transfectadas con pcDNA3-BCRP que se descubrió que sobreexpresaban BCRP (clones 6 y 8) y se expandieron para estudios adicionales (Figura 4A). Un tercer clon de las células transfectadas con pcDNA3-BCRP, el clon 19, no sobreexpresaba BCRP, y se seleccionó para el estudio como control.

Ejemplo 10

Efecto de Fármacos Quimioterapéuticos en Células MCF-7 transfectadas con BCRP

Se examinó la acumulación y retención de daunorrubicina en las células transfectadas mediante citometría de flujo. Los clones 6 y 8 que sobreexpresan BCRP presentaron una acumulación y retención disminuida de daunorrubicina, en comparación con los controles transfectados con vector (Figura 4B), con concentraciones de estado estacionario intracelular de fármaco en los clones 8 y 6 respectivamente de aproximadamente el 30% o el 50% de las obtenidas en las células de control de vector. Esta diferencia no se debió a diferencias en el volumen de células, ya que los volúmenes de las sublíneas que sobreexpresan BCRP ensayadas no era menor que la de las células de control transfectadas con vector vacío. Los volúmenes de células, medidos por Coulter Channelyzer™ son 2515±56, 3074±112 y 2459±56 μm^3 para el clon 6 MCF-7/BCRP, clon 8 MCF-7/BCRP y las células de control con vector MCF-7/pcDNA3, respectivamente. Estos valores son comparables con las mediciones previas de los volúmenes de células MCF-7 (5).

La sensibilidades de las diversas sublíneas transfectadas a los agentes quimioterapéuticos se ensayaron por el ensayo de citotoxicidad con sulforrodamina-B (SRB) (14). Se calculó la LC_{50} definida como la concentración de fármaco que causaba letalidad al 50% de las células. A partir de esto, se calculó "Factor de Resistencia" (RF) dividiendo la LC_{50} para un fármaco dado frente a una línea celular transfectada por la LC_{50} de ese fármaco frente a células MCF-7 no transfectadas. Los clones 6 y 8 que sobreexpresan BCRP presentaron resistencia a mitoxantrona, daunorrubicina y doxorrubicina, en comparación con las células del clon 19 que no sobreexpresan BCRP, células MCF-7, o los controles transfectados con vector vacío (Figuras 4C, 4D, 5). La Figura 5 contiene los valores de LC_{50} medios para múltiples experimentos de citotoxicidad para todas las líneas celulares y fármacos ensayados. La Figura 4D muestra estudios de LC_{50} típicos para los seis fármacos ensayados para células MCF-7/W y células MCF-7/pcDNA3-BCRP clon 8 para ilustrar los datos de los que se obtuvieron los valores de LC_{50}, y la exactitud de las mediciones. El asterisco y la línea continua en la Figura 4D indican células MCF-7/W, los cuadrados cerrados y las líneas de puntos representan células del clon 8 MCF-7/pcDNA3-BCRP. Las barras verticales en la Figura representan la desviación típica de seis determinaciones duplicadas.

Como las células MCF-7/AdrVp, los clones 6 y 8 transfectantes de MCF-7/BCRP presentaron el mayor grado de resistencia a mitoxantrona. El patrón de resistencia cruzada presentada por las células transfectadas que sobreexpresan BCRP es muy similar al presentado por células MCF-7/AdrVp, excepto que las células MCF-7/AdrVp tienen mayor resistencia relativa a todos los fármacos citotóxicos en el fenotipo. Los clones 6 y 8 transfectados con BCRP per-

manecieron relativamente sensibles a idarrubicina, cisplatino y paclitaxel (taxol), ya que son células MCF-7/AdrVP (Figuras 4C, 4D y 5).

Para determinar los efectos del agotamiento del ATP sobre la retención de rodamina 123 por las células transfectadas con BCRP en comparación con los controles, se incubaron células en medio completo o en condiciones de agotamiento de ATP. Se agotó el ATP de las células MCF-7 por incubación en DMEM libre de glucosa que contenía 2-desoxi-D glucosa 50 mM y azida sódica 15 mM durante 20 minutos (37ºC). Se añadió rodamina 123 (0,5 μg/ml de concentración final) durante 30 minutos más. Las células se colocaron en hielo, se lavaron de rodamina, y se incubaron en condiciones de agotamiento de ATP durante 30 minutos más, y se determinó la retención de rodamina por citometría de flujo (excitación 488 nm, emisión 520 nm). Esto demuestra que la función de transporte de BCRP parece depender del ATP.

Ejemplo 11

Expresión de BCRP en células blásticas de pacientes con leucemia mielogénica aguda (AML) detectada por un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)

Los ensayos de RT-PCR se realizaron usando una modificación de los descritos previamente para la beta actina y MRP (10), excepto en que se usaron cebadores específicos para BCRP en lugar de MRP. Para BCRP, los cebadores usados fueron (con sentido) 5'-TTA GGA TTG AAG CCA AAG G-3' (SEC ID Nº 5) y (antisentido) 5'-TAG GCA ATT GTG AGG AAA ATA-3' (SEC ID Nº 6). El extremo 5' del cebador con sentido comienza en la posición nucleotídica 1727 del ADNc de BCRP (SEC ID Nº 2 y Figura 2C); el extremo 3' de la sonda antisentido corresponde a la posición 2152 del ADNc de BCRP (Figura 2C). Las concentraciones finales de los cebadores usados fueron 200 nM. La concentración de magnesio final usada para PCR fue 700 μM. Se realizaron treinta y cinco ciclos de desnaturalización (94ºC, 1 minuto), hibridación (50ºC, 1 minuto) y elongación (72ºC, 2 minutos). Después de la electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de la mezcla de reacción de PCR, los geles se transfirieron a nitrocelulosa y se hizo la transferencia de Southern como se ha descrito previamente (12), usando el producto de PCR del clon 8 de 795 pb (extremo 5' marcado por ^{32}P-dCTP) como sonda para BCRP. La longitud del producto de PCR esperada es 446 pb.

El ARN celular total se obtuvo de las células blásticas de catorce pacientes con AML. Se hicieron controles usando volúmenes variables de la mezcla de reacción de PCR que se proceso con ARN de MCF-7/W transcrito de forma inversa. Los resultados de estos controles y los ensayos de RT-PCR de las muestras de células blásticas de los pacientes se representan en la Figura 7. Estos controles que usan ARN de MCF-7/W indican que el ensayo de RT-PCR que se desarrolló es cuantitativo. Obsérvese en la Figura 7 que algunos pacientes tienen niveles muy bajos de expresión de BCRP, mientras que otros (pacientes 3, 4, 5 y 7) tienen niveles de expresión comparables con o mayores que el de las células MCF-7/W. Esta variación en la expresión de BCRP entre muestras de células blásticas de pacientes AML mantiene abierta la posibilidad de que esos pacientes que tienen una expresión relativamente elevada de BCRP sean más resistentes al tratamiento con los fármacos anti-neoplásicos que son susceptibles a la resistencia causada por BCRP (antraciclinas y mitoxantronas). La mitoxantrona y la antraciclina daunorrubicina son fármacos importantes usados en el tratamiento de AML.

Ejemplo 12

Hibridación de transferencia de Northern en diversas líneas celulares de cáncer

Se usó el ARN celular total para el análisis de Northern en todos los casos excepto para células H209 o H69, en las que se usó poli A+. La extracción de ARN y la transferencia de Northern se realizaron por técnicas convencionales, y como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se usó un fragmento de 795 pb (clon 8, SEC ID Nº 7) del extremo 3' del ADNc de BCRP de 2418 pb como sonda de hibridación después de marcarla con [^{32}P]-dCTP (kit de marcaje "Prime-a-Gene", Promega, Madison, WI). Para controlar las variaciones en la carga de muestra, se separaron las transferencias, después se re-hibridaron con β-actina marcada con ^{32}P o sondas de ARN 18S.

La Figura 8A muestra los resultados de la hibridación de transferencia de Northern del ARNm de células MCF-7 (carril 1), células MCF-7/MITOX (carril 2), células 8226/ W (carril 3), y células 8226/MR20 (carril 4). La transferencia se sondeo para BCRP con un ADNc de 795 pb (Clon 8, SEC ID Nº 7) después de marcar con ^{32}P-dCTP (panel superior). Para controlar la equivalencia en la carga de muestra, se separó la transferencia y se volvió a sondear para la β-actina.

La Figura 8B muestra los resultados de una hibridación de transferencia de Northern de ARNm de células S1/M1-3.2 (carril 1), células S1/W (carril 2), células MCF-7/W (carril 3), células MCF-7/MX_{PR} (carril 4), células MCF-7/MX_{RS250} (carril 5), células MCF-7/MX_{RS600} (carril 6), células MCF-7/VP (MRP+) (carril 7), células MCF-7/Adr (Pgp+) (carril 8), células MCF-7/MTX (DHFR+) (carril 9), MCF-7/AdrVp1000 (BCRP+) (carril 10). La transferencia se sondeó como se ha descrito para la Figura 8A.

La Figura 8C muestra una hibridación de transferencia de Northern de ARNm de células HT29 de carcinoma de colon humano (carril 1), células HT29RNOV (carril 2), células MDA-MB-231 de carcinoma de mama humano (carril 3), células MDA-MB 231RNOV (carril 4), células EPF86-079 de fibrosarcoma humano (carril 5), células EPF86-079RNOV (carril 6), células EPG85-257 de carcinoma gástrico humano (carril 7), células EPG85-257RNOV (carril

8), células EPG85-257RDB (Pgp+) (carril 9), células EPP85-181 de carcinoma pancreático humano (carril 10), células EPP85181RNOV (carril 11), y células EPP85-181RDB (Pgp+) (carril 12). Las transferencias se sondearon como se ha descrito anteriormente para la Figura 8A.

Ejemplo 13

Hibridación de transferencia de Southern

Se aisló el ADN genómico usando técnicas convencionales (8) de las células MCF-7/W sensibles al fármaco parental (carriles 1, 7), células MCF-7/MX_{PR} (carriles 2, 8); células MCF-7/MX_{RS250} (carriles 3, 9), células MCF-7/MX_{RS600} (calles 4, 10), células MCF-7/VP (sobreexpresión de MRP, carriles 5, 11), y células MCF-7/MTX (derivados de resistencia por sobreexpresión de DHFR, carriles 6, 12), se digirió con EcoR1 o BamH1, se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se tiñó con bromuro de etidio, se transfirió, y se fijó a un filtro de nitrocelulosa usando técnicas convencionales (8). El filtro se hibridó con la sonda de BCRP de 795 pb marcada con [^{32}P] como se ha descrito anteriormente para la Figura 8 (Figura 9, panel superior). La electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio del ADN genómico después de la digestión con las endonucleasas de restricción, y antes de la transferencia al filtro de nitrocelulosa, demostró una equivalencia aproximada de la carga de muestra (Figura 9, panel inferior).

Ejemplo 14

Efectos de fumitremorgina C (FTC) en las células transfectadas con BCRP

Se cultivaron células MCF-7 transfectadas con el vector vacío pcDNA3 o pcDNA3 que contiene el ADNc de BCRP de longitud completa (clon transfectante 8) en forma de monocapas en matraces de cultivo tisular. Los efectos de FTC en la acumulación de aza-antrapirazol BBR3390 se midieron exponiendo estas células al aza-antrapirazol BCR3390 fluorescente (5 μM) en presencia o ausencia de FTC 10 μM durante 60 minutos. Después, se retiraron las células de los matraces por tratamiento con tripsina, y se midió el contenido de BBR3390 intracelular por citometría de flujo. Se midieron los efectos de FTC sobre la retención de BBR3390 exponiendo otro conjunto de células (control de vector y clon 8 transfectante) a BBR3390 5 μM y sin FTC 10 μM durante 60 minutos, retirando por lavado de las células el fármaco, después reincubando las células durante 30 minutos más en medio reciente con y sin FTC. Se midió el contenido de BBR3390 intracelular por citometría de flujo. (Véase la Figura 10).

Referencias

1. **Kessel** D, **Botterill** V and **Wodinsky** I, Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemia cells as factors in drug response, Cancer Res 28: 938-941, 1968; Bewilder JCL and Rheum H, Cellular resistance to actinomycin D in Chinese Hamster cells *in vitro*:

Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30: 1174-1184, 1970; Ling V and Thompson LH, Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance in a series of independently-derived VP-16 resistant human tumour cell lines, *J Cell Physiol* 83: 103-116, 1974.

2. **Cole** SPC, **Bhardwaj** G, **Gerlach** JH, **Mackie** JE, **Grant** CE, **Almquist** KC, **Stewart** AJ, **Kurz** EU, **Duncan** AMV and **Deeley** RG: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654, 1992.

3. **Chen** Y-N, **Mickley** LA, **Schwartz** AM, **Acton** EM, **Hwang** J, **Fojo** AT. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J. Biol. Chem*. 265: 10073-10080, 1990.

4. **Lee** JS., **Scala** S, **Matsumoto** Y, **Dickstein** B, **Robey** R, **Zhan** Z, **Altenberg** G, **Bates** SE. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. *J Cell Biochem* 65: 513-526, 1997.

5. **Doyle** LA, **Ross** DD, **Sridhara** R, **Fojo** AT, **Kaufmann** SH, **Lee** EJ, **Schiffer** CA. Expression of a 95 kDa membrane protein is associated with low daunorubicin accumulation in leukaemic blast cells. Br. *J. Cancer* 71, 52-58, 1995.

6. **Liang** P and **Pardee** A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992; **Liang** P, **Averboukh** L, **Keyomarsi** K, **Sager** R and **Pardee** A. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 52: 6966-6968, 1992).

7. **Kohler** *et al.* (*Nature* **256**: 495 (1975); *Eur. J. Immunol*. **6**: 511 (1976); *Euro J. Immunol*. **6**: 292 (1976).

8. **Maniatis**, T. *et al. In: Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982), and by Haymes, B. D. *et al*., In: *Nucleic Acid Hybridizations, A Practical Approach*. IRL Press, Washington, D.C. (1985)

9. **Morgan** TH. Sex limited inheritance in Drosophila. *Science* 32: 120-122, 1910; **Bingham** PM, **Levis** R, **Rubin** GM. Cloning of DNA sequences from the white locus of D melanogaster by a novel and general method. *Cell* 25: 693-704, 1981; **O'Hare** K, **Murphy** C, **Levis** R, **Rubin** GM. DNA sequence of the white locus of Drosophila melanogaster. *J Mol Biol* 180: 437-455, 1984; Pepling M, Mount SM. Sequence of a cDNA from the Drosophila melanogaster white gene. *Nucleic Acids Res* 18: 1633, 1990; **Chen** H, **Rossier** C, **Lalioti** MD, **Lynn** A, **Chakravarti** A, **Perrin** G, **Antonarkis** SE. Cloning of the cDNA for a human homologue of the Drosophila white gene and mapping to Chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet* 59: 66-75, 1996.

10. **Ross** DD, **Doyle** LA, **Schiffer** CA, **Lee** EJ, **Grant** CE, **Cole** SPC, **Deeley** RG, **Yang** W and **Tong** Y. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA in blast cells from acute myeloid leukemia (AML) patients. *Leukemia* 10: 48-55, 1996.

11. **Walker**, J.E., **Saraste**, M., **Runswick**, M.J., **Gay**, N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1: 945-951, 1982.

12. **Pugh**, E.L., **Wakil**, S.J. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XIV. The prosthetic group of acyl carrier protein and the mode of its attachment to protein. *J. Biol. Chem*. 240: 4727-4733, 1965

13. **Rao** JKM, and **Garos** P. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 899: 179-214, 1986.

14. **Skehan** P, **Storeng** R, **Scudiero** D, **Monks** A, **McMahon** J, **Vistica** D, **Warren** JT, **Bokesch** H, **Kenny** S, **Boyd** MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112, 1990.

15. **Ross** DD, **Gao** Y, **Yang** Y, **Leszyk** J, **Shively** J, **Doyle** LA. The 95-kilodalton membrane glycoprotein overexpressed in novel multidrug resistant breast cancer cells is NCA, the nonspecific cross-reacting antigen of carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 57: 5460-5464, 1997.

16. **Kawaharata** H, **Hinoda** Y, **Itoh** F, **Endo** T, **Oikawa** S, **Nakazato** H, **Imai** K. Decreased sensitivity of carcinoembryonal antigen cDNA-transfected cells to adriamycin. *Int J Cancer* 72, 377-382, 1997.

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K, editors. Current protocols in molecular biology, volume 1, chapter 9. John Wiley and Sons, N.Y., 1989.

17. **Harker** WG, **Slade** DL, **Dalton** WS, **Meltzer** PS, **Trent** JM. Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res* 49: 4542-4549, 1989.

18. **Taylor** CW, **Dalton** WS, **Parrish** PR, **Gleason** MC, **Bellamy** WT, **Thompson** FH, **Roe** DJ, **Trent** JM. Different mechanisms of deceased drug accumulation in doxorubicin and mitoxantrone resistant variants of the MCF-7 human breast cancer cell line. *Br J Cancer* 63: 923-929, 1991.

19. **Nakagawa** M, **Schneider** E, **Dixon** KH, m **Horton** J, **Kelley** K, **Morrow** C, **Cowan** K. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 52: 6175-6181, 1992.

20. **Yang** C-HJ, **Cowan** K, **Schneider** E. Reselection of a mitoxantrone-resistant breast carcinoma cell line with mitoxantrone results in a parallel increase in cross-resistance to camptothecin analogues. *Proc Amer Assoc Cancer Res* (abstract) 37: 308, 1996.

21. **Schneider** E, **Horton** JK, **Yang** C-H, **Nakagawa** M, **Cowan** KH. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res* 54: 152-158, 1994.

22. **Fairchild** CR, **Ivy** PS, **Kao-Shan** C-S, **Whang-Peng** J, **Rosen** N, **Israel** MA, **Melera** PW, **Cowan** KH, **Goldsmith** ME. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adreamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* 47: 5141-5148, 1987.

23. **Cowan** KH, **Goldsmith** ME, **Levine** RM, **Aitken** SC, **Douglass** E, **Clendeninn** N, **Neinhuis** AW, **Lipman** ME. Dihydrofolate reductase gene amplification and possible rearrangement in estrogen-responsive methotrexate resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 257: 15079-15086, 1982.

24. **Futcher** BW, **Abbaszadegan** MR, **Domann** F, **Dalton** WS. Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected, multidrug resistant human tumour cells. *Biochem Pharm* 47: 1601, 1994.

25. **Rabindran** SK, **He** H, **Singh** M, **Brown** E, **Collins** KI, **Annable** T, **Greenberger** LM. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res* 58: 5850-5858, 1998.

26. **Yu** Q, **Mirski** SEL, **Sparks** KE, **Cole** SPC. Two COOH-truncated cytoplasmic forms of topoisomerase IIα in a VP-16 selected lung cancer cell line result from partial gene deletion and alternative splicing. *Biochemistry* 36: 5868-5877, 1997.

27. **Dietel** M, **Arps** H, **Lage** H, **Neindorf** A. Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res* 50: 6100-6106, 1990.

28. **Kellner** U, **Hutchinson** L, **Seidel** A, **Lage** H, **Danks** MK, **Deitel** M, **Kaufmann** SH. Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma in the absence of P-glycoprotein. *Int J Cancer* 71: 817-824, 1997.

29. **Holm** PS, **Scanlon** KJ, **Dietel** M. Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell lin (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br J Cancer* 70: 239-243, 1994.

30. **Harker** WG, **Slade** DL, **Dalton** WS, **Meltzer** PS, **Trent** JM. Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res* 49: 4542-4549, 1989.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que tiene la secuencia de la SEC ID Nº 1 (Proteína de Resistencia de Cáncer de Mama, BCRP) que induce resistencia a los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer en células de cáncer de mama.

2. El polipéptido de la reivindicación 1 que es de aproximadamente 655 aminoácidos de longitud.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene una masa molecular de 72,3 kilodalton.

4. Un anticuerpo que se une al polipéptido de la reivindicación 1.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4 que es monoclonal.

6. El anticuerpo de la reivindicación que es policlonal.

7. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.

8. La secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 7 que es la secuencia de la SEC ID Nº 2.

9. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 2.

10. Una sonda antisentido que inhibe la expresión del polipéptido de la reivindicación 1.

11. La sonda antisentido de la reivindicación 10 que es la cadena complementaria de la secuencia de la SEC ID Nº 7.

12. Un método para determinar la causa de la resistencia de un paciente a los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer ensayando *in vitro* la expresión del polipéptido de la reivindicación 1, por lo que la sobreexpresión de dicho polipéptido indica que esa es la causa.

13. Uso del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para preparar un medicamento para inhibir la actividad de la Proteína de Resistencia de Cáncer de Mama.

14. Uso de la sonda de la reivindicación 11 para preparar un medicamento para inhibir la actividad de la Proteína de Resistencia de Cáncer de Mama.

15. Uso del anticuerpo de la reivindicación 4 para preparar un medicamento para potenciar un tratamiento quimioterapéutico del paciente contra el cáncer.

16. Uso de la sonda de la reivindicación 11 para preparar un medicamento para potenciar un tratamiento quimioterapéutico del paciente contra el cáncer.

17. Uso de Fumitremorgina C para preparar un medicamento para potenciar un tratamiento quimioterapéutico del paciente contra el cáncer de mama.

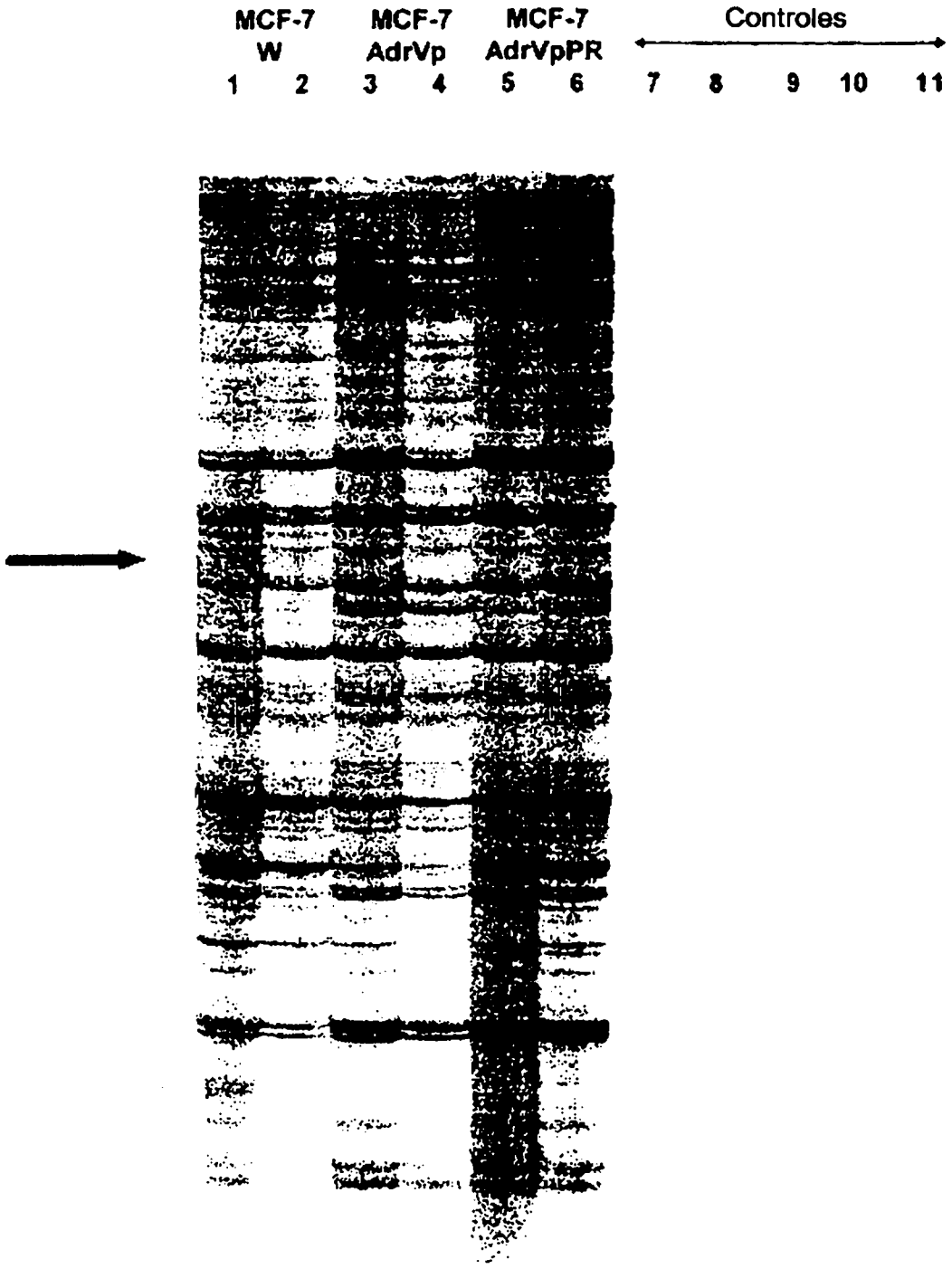
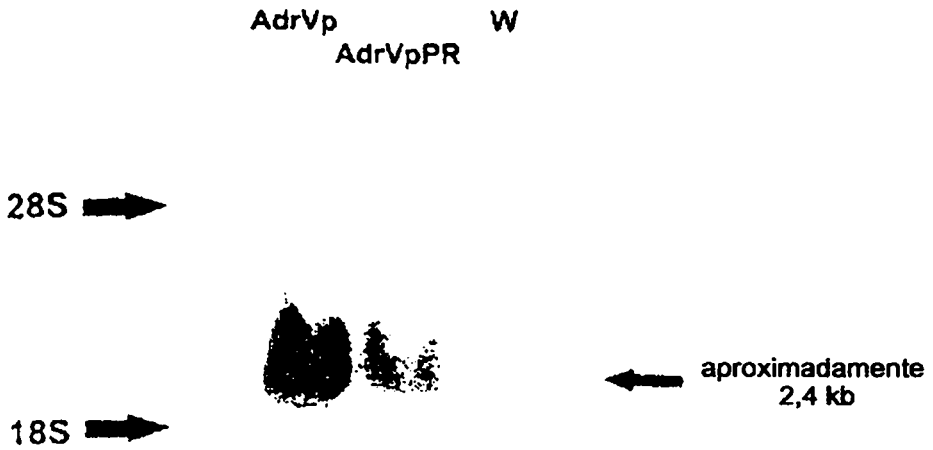


FIG. IA


AdrVp
W
AdrVpPR
28S
18S
aproximadamente
2,4 kb

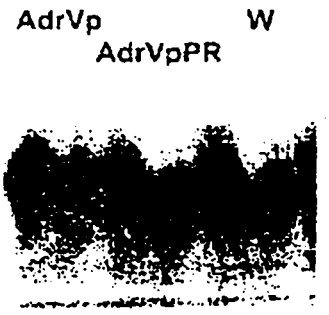

AdrVp
W
AdrVpPR

FIG. IB

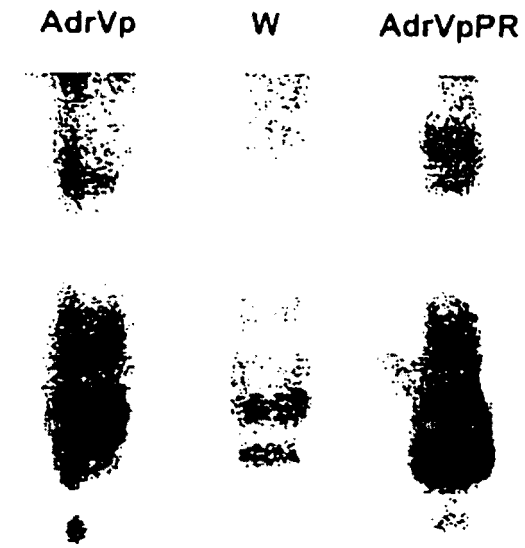


FIG. IC

Secuencia Peptídica de BCRP

Longitud: 663 aminoácidos

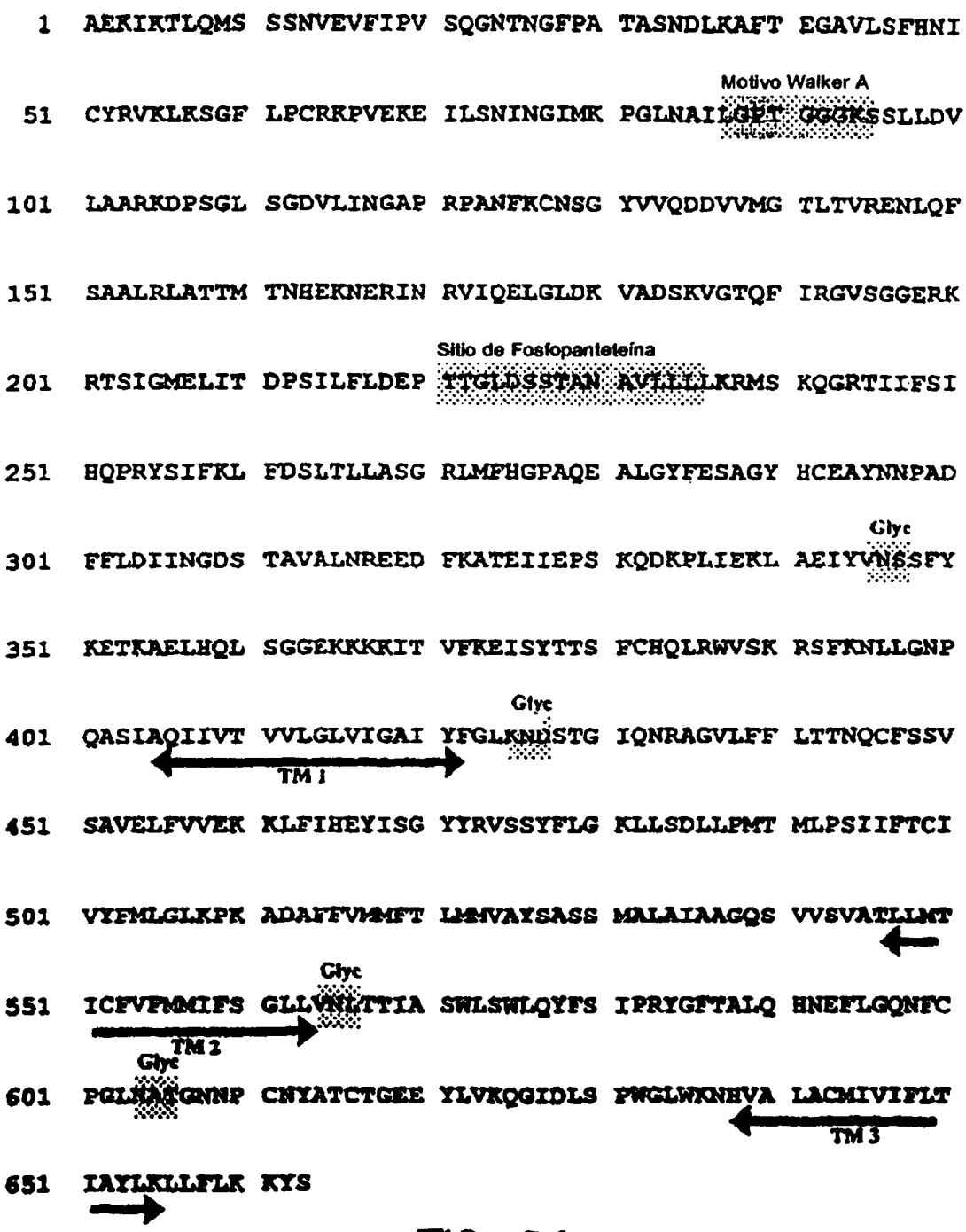


FIG. 2A

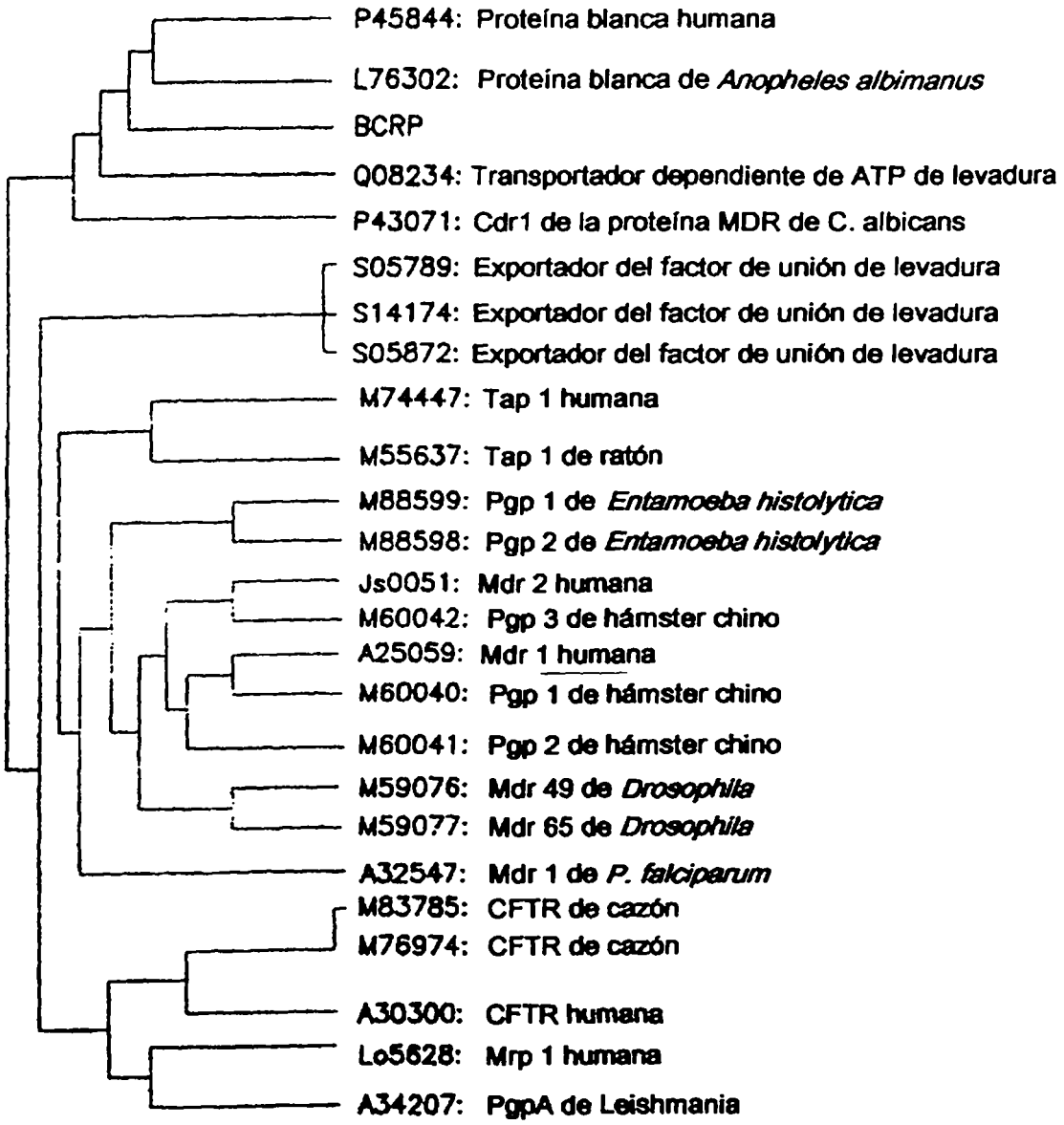

P45844: Proteína blanca humana
L76302: Proteína blanca de *Anopheles albimanus*
BCRP
Q08234: Transportador dependiente de ATP de levadura
P43071: Cdr1 de la proteína MDR de C. albicans
S05789: Exportador del factor de unión de levadura
S14174: Exportador del factor de unión de levadura
S05872: Exportador del factor de unión de levadura
M74447: Tap 1 humana
M55637: Tap 1 de ratón
M88599: Pgp 1 de *Entamoeba histolytica*
M88598: Pgp 2 de *Entamoeba histolytica*
Js0051: Mdr 2 humana
M60042: Pgp 3 de hámster chino
A25059: Mdr 1 humana
M60040: Pgp 1 de hámster chino
M60041: Pgp 2 de hámster chino
M59076: Mdr 49 de *Drosophila*
M59077: Mdr 65 de *Drosophila*
A32547: Mdr 1 de *P. falciparum*
M83785: CFTR de cazón
M76974: CFTR de cazón
A30300: CFTR humana
Lo5628: Mrp 1 humana
A34207: PgpA de Leishmania

FIG. 2B

```
  1   GGGAGGAGGC AGCCTGTGGA GGAACTGGGT AGGATTTAGG AACGCACCGT
 51   GCACATGCTT GGTGGTCTTG TTAAGTGGAA ACTGCTGCTT TAGAGTTTGT
101   TTGGAAGGTC CGGGTGACTC ATCCCAACAT TTACATCCTT AATTGTTAAA
151   GCGCTGCCTC CGAGCGCACG CATCCTGAGA TCCTGAGCCT TTGGTTAAGA
201   CCGAGCTCTA TTAAGCTGAA AAGATAAAAA CTCTCCAGAT GTCTTCCAGT
251   AATGTCGAAG TTTTTATCCC AGTGTCACAA GGAAACACCA ATGGCTTCCC
301   CGCGACAGCT TCCAATGACC TGAAGGCATT TACTGAAGGA GCTGTGTTAA
351   GTTTTCATAA CATCTGCTAT CGAGTAAAAC TGAAGAGTGG CTTTCTACCT
401   TGTCGAAAAC CAGTTGAGAA AGAAATATTA TCGAATATCA ATGGGATCAT
451   GAAACCTGGT CTCAACGCCA TCCTGGGACC CACAGGTGGA GGCAAATCTT
501   CGTTATTAGA TGTCTTAGCT GCAAGGAAAG ATCCAAGTGG ATTATCTGGA
551   GATGTTCTGA TAAATGGAGC ACCGCGACCT GCCAATTTCA AATGTAATTC
601   AGGTTACGTG GTACAAGATG ATGTTGTGAT GGGCACTCTG ACGGTGAGAG
651   AAAACTTACA GTTCTCAGCA GCTCTTCGGC TTGCAACAAC TATGACGAAT
701   CATGAAAAAA ACGAACGGAT TAACAGGGTC ATTCAAGAGT TAGGTCTGGA
751   TAAAGTGGCA GACTCCAAGG TTGGAACTCA GTTTATCCGT GGTGTGTCTG
801   GAGGAGAAAG AAAAAGGACT AGTATAGGAA TGGAGCTTAT CACTGATCCT
851   TCCATCTTGT TCTTGGATGA GCCTACAACT GGCTTAGACT CAAGCACAGC
```

FIG. 2C-1

```
 901   AAATGCTGTC CTTTTGCTCC TGAAAAGGAT GTCTAAGCAG GGACGAACAA
 951   TCATCTTCTC CATTCATCAG CCTCGATATT CCATCTTCAA GTTCTTTGAT
1001   AGCCTCACCT TATTGGCCTC AGGAAGACTT ATGTTCCACG GGCCTGCTCA
1051   GGAGGCCTTG GGATACTTTG AATCAGCTGG TTATCACTGT GAGGCCTATA
1101   ATAACCCTGC AGACTTCTTC TTGGACATCA TTAATGGAGA TTCCACTGCT
1151   GTGGCATTAA ACAGAGAAGA AGACTTTAAA GCCACAGAGA TCATAGAGCC
1201   TTCCAAGCAG GATAAGCCAC TCATAGAAAA ATTAGCGGAG ATTTATGTCA
1251   ACTCCTCCTT CTACAAAGAG ACAAAAGCTG AATTACATCA ACTTTCCGGG
1301   GGTGAGAAGA AGAAGAAGAT CACGGTCTTC AAGGAGATCA GCTACACCAC
1351   CTCCTTCTGT CATCAACTCA GATGGGTTTC CAAGCGTTCA TTCAAAAACT
1401   TGCTGGGTAA TCCCCAGGCC TCTATAGCTC AGATCATTGT CACAGTCGTA
1451   CTGGGACTGG TTATAGGTGC CATTTACTTT GGGCTAAAAA ATGATTCTAC
1501   TGGAATCCAG AACAGAGCTG GGGTTCTCTT CTTCCTGACG ACCAACCAGT
1551   GTTTCAGCAG TGTTTCAGCC GTGGAACTCT TTGTGGTAGA GAAGAAGCTC
1601   TTCATACATG AATACATCAG CGGATACTAC AGAGTGTCAT CTTATTTCCT
1651   TGGAAAACTG TTATCTGATT TATTACCCAT GACGATGTTA CCAAGTATTA
                              5' 1727          1744
1701   TATTTACCTG TATAGTGTAC TTCATGTTAG GATTGAAGCC AAAGGCAGAT
                               5' PCR PRIMER (SENSE)
1751   GCCTTCTTCG TTATGATGTT TACCCTTATG ATGGTGGCTT ATTCAGCCAG
1801   TTCCATGGCA CTGGCCATAG CAGCAGGTCA GAGTGTGGTT TCTGTAGCAA
```

FIG. 2C-2

```
1851    CACTTCTCAT GACCATCTGT TTTGTGTTTA TGATGATTTT TTCAGGTCTG

1901    TTGGTCAATC TCACAACCAT TGCATCTTGG CTGTCATGGC TTCAGTACTT

1951    CAGCATTCCA CGATATGGAT TTACGGCTTT GCAGCATAAT GAATTTTTGG

2001    GACAAAACTT CTGCCCAGGA CTCAATGCAA CAGGAAACAA TCCTTGTAAC

2051    TATGCAACAT GTACTGGCGA AGAATATTTG GTAAAGCAGG GCATCGATCT

2101    CTCACCCTGG GGCTTGTGGA AGAATCACGT GGCCTTGGCT TGTATGATTG
          2152                  2172
2151    TTATTTTCCT CACAATTGCC TACCTGAAAT TGTTATTTCT TAAAAAATAT
                                5'
2201    TCTTAAATTT CCCCTTAATT CAGTATGATT TATCCTCACA TAAAAAAGAA

2251    GCACTTTGAT TGAAGTATTC AATCAAGTTT TTTTGTTGTT TTCTGTTCCC

2301    TTGCCATCAC ACTGTTGCAC AGCAGCAATT GTTTTAAAGA GATACATTTT

2351    TAGAAATCAC AACAAACTGA ATTAAACATG AAAGAACCCA AAAAAAAAGA

2401    TATCACTCAG CATAATGA
```

FIG. 2C-3

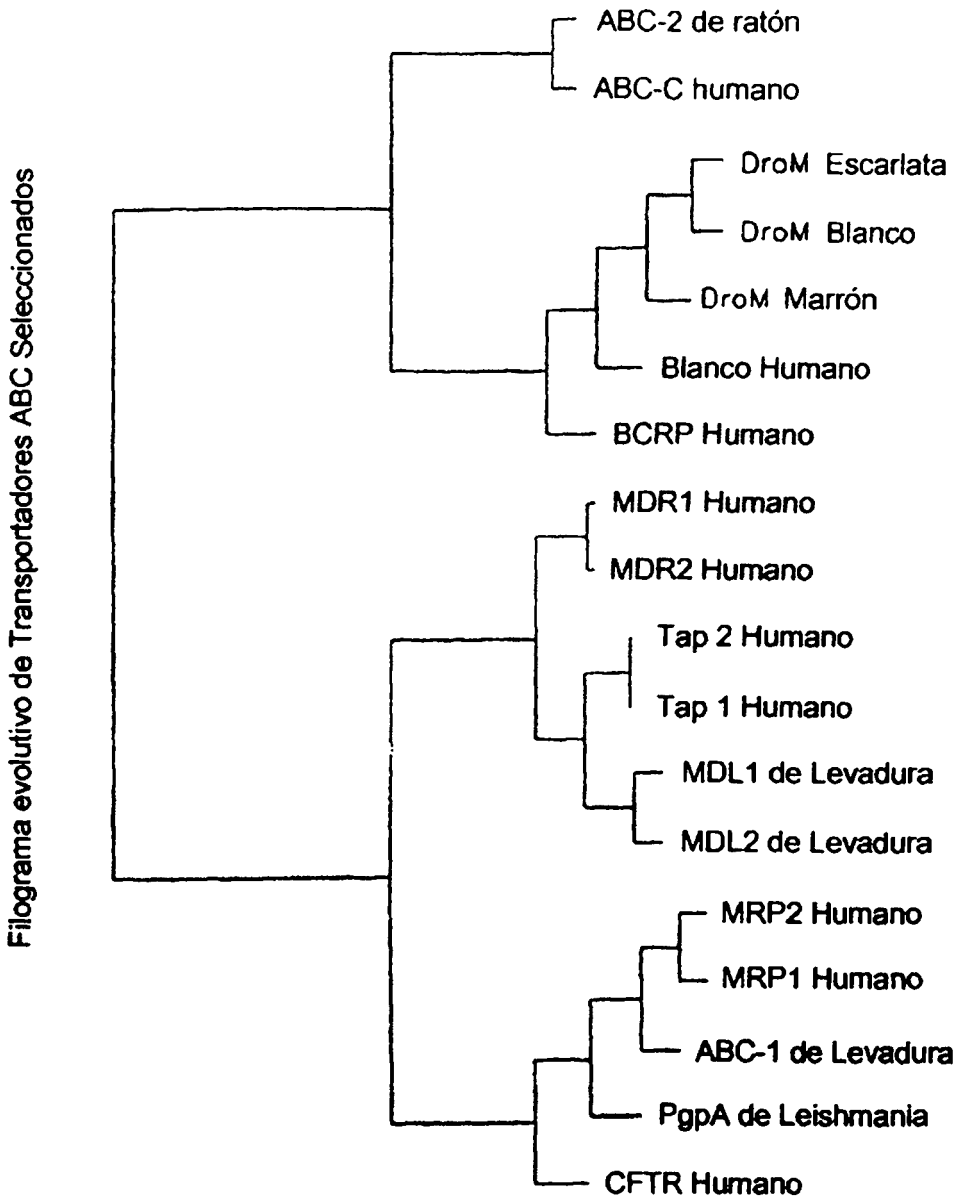

Filograma evolutivo de Transportadores ABC Seleccionados
ABC-2 de ratón
ABC-C humano
DroM Escarlata
DroM Blanco
DroM Marrón
Blanco Humano
BCRP Humano
MDR1 Humano
MDR2 Humano
Tap 2 Humano
Tap 1 Humano
MDL1 de Levadura
MDL2 de Levadura
MRP2 Humano
MRP1 Humano
ABC-1 de Levadura
PgpA de Leishmania
CFTR Humano

FIG. 2D

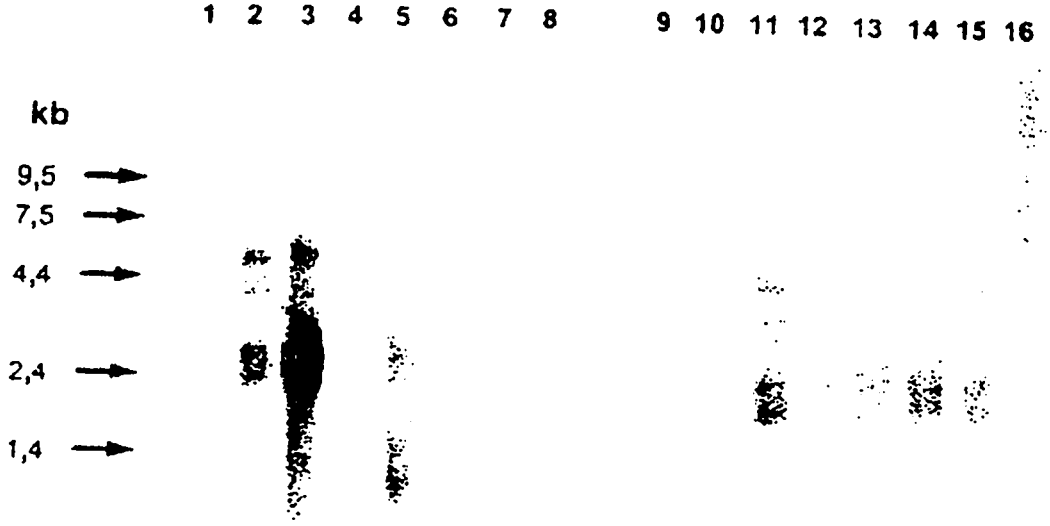


FIG. 3

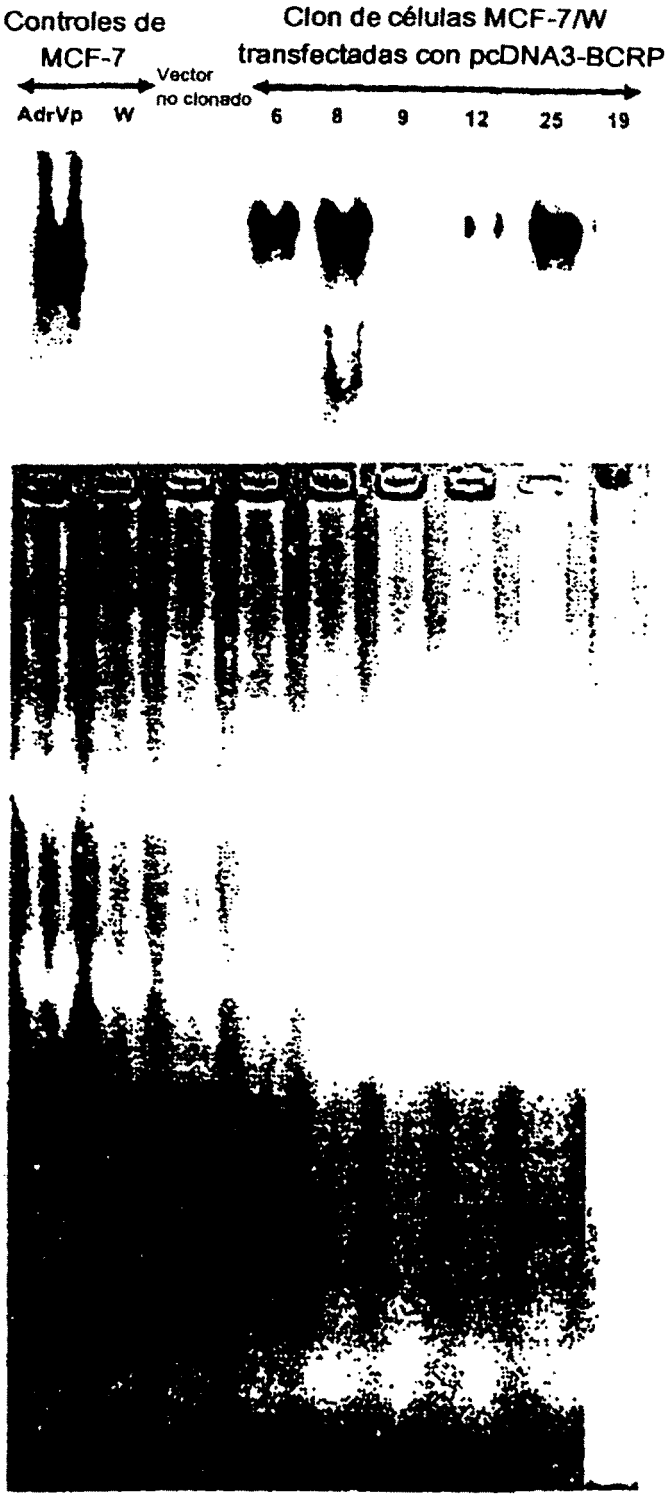

Controles de MCF-7
Clon de células MCF-7/W transfectadas con pcDNA3-BCRP
Vector no clonado
AdrVp
W
6
8
9
12
25
19

FIG. 4A

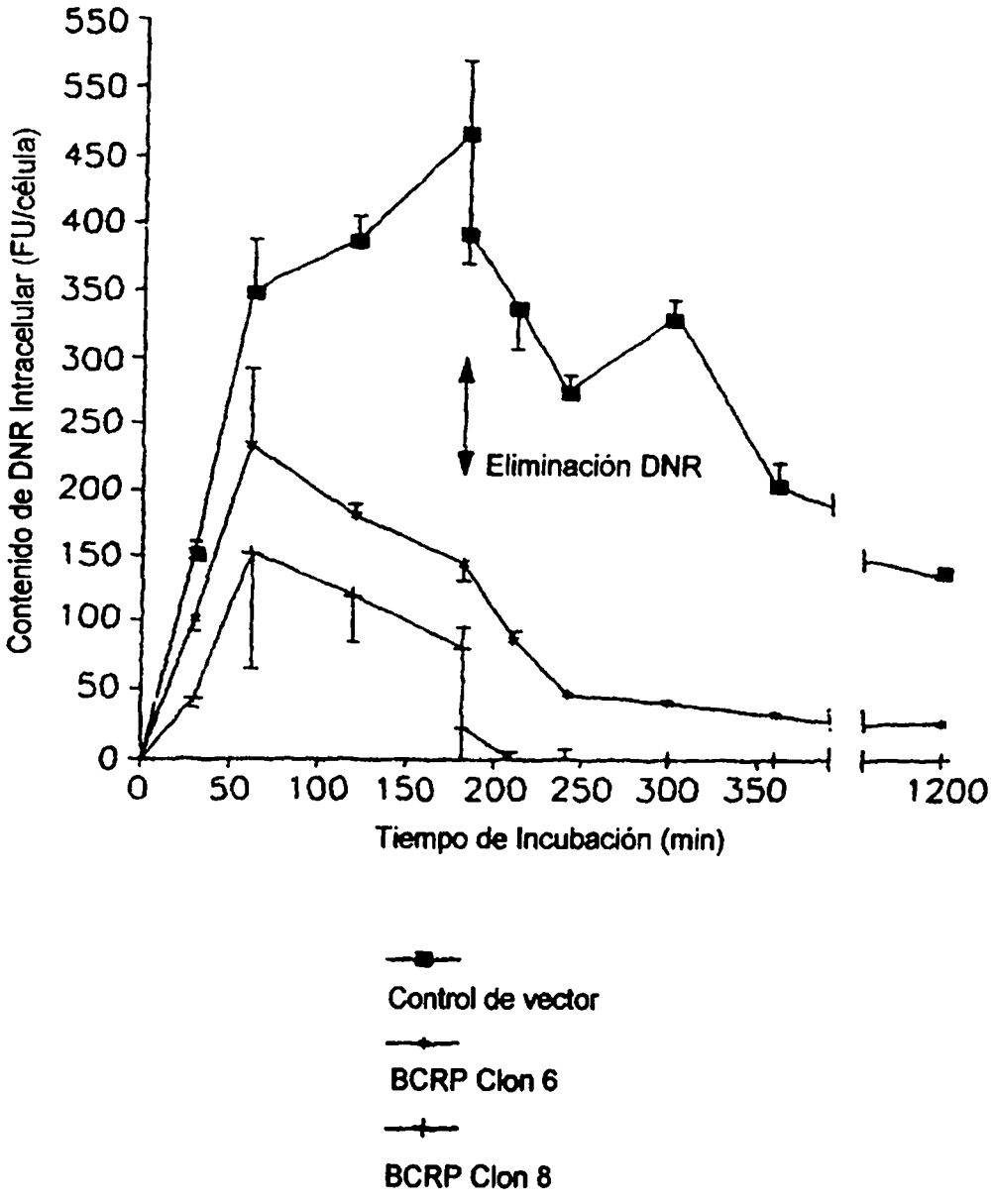

Contenido de DNR Intracelular (FU/célula)
550
550
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200
250
300
350
1200
Tiempo de Incubación (min)
Eliminación DNR
Control de vector
BCRP Clon 6
BCRP Clon 8

FIG. 4B

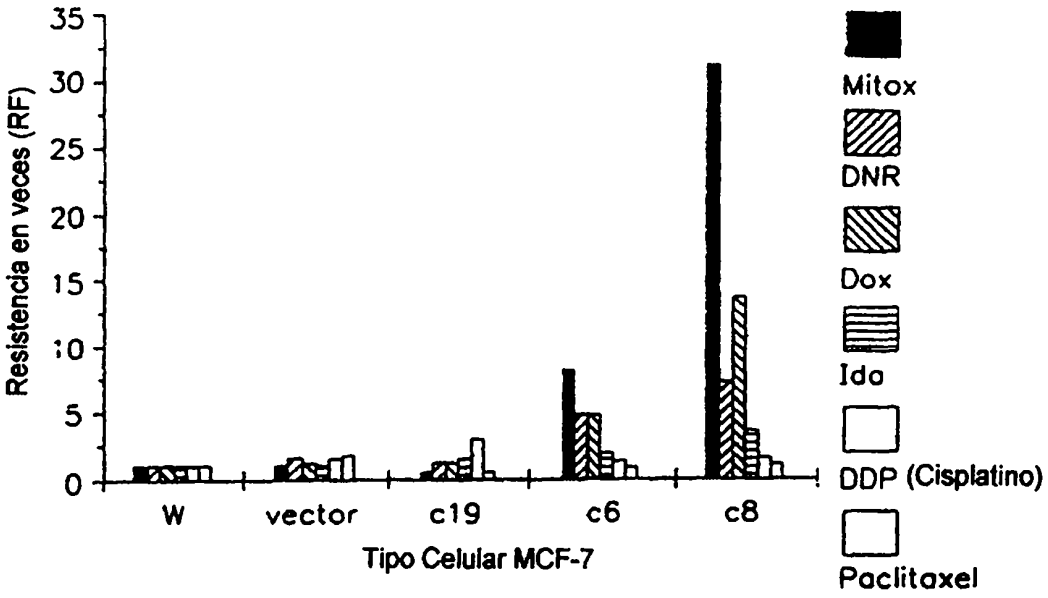

35
30
25
20
15
10
5
0
Resistencia en veces (RF)
W
vector
c19
c6
c8
Tipo Celular MCF-7
Mitox
DNR
Dox
Ida
DDP (Cisplatino)
Paclitaxel

FIG. 4C

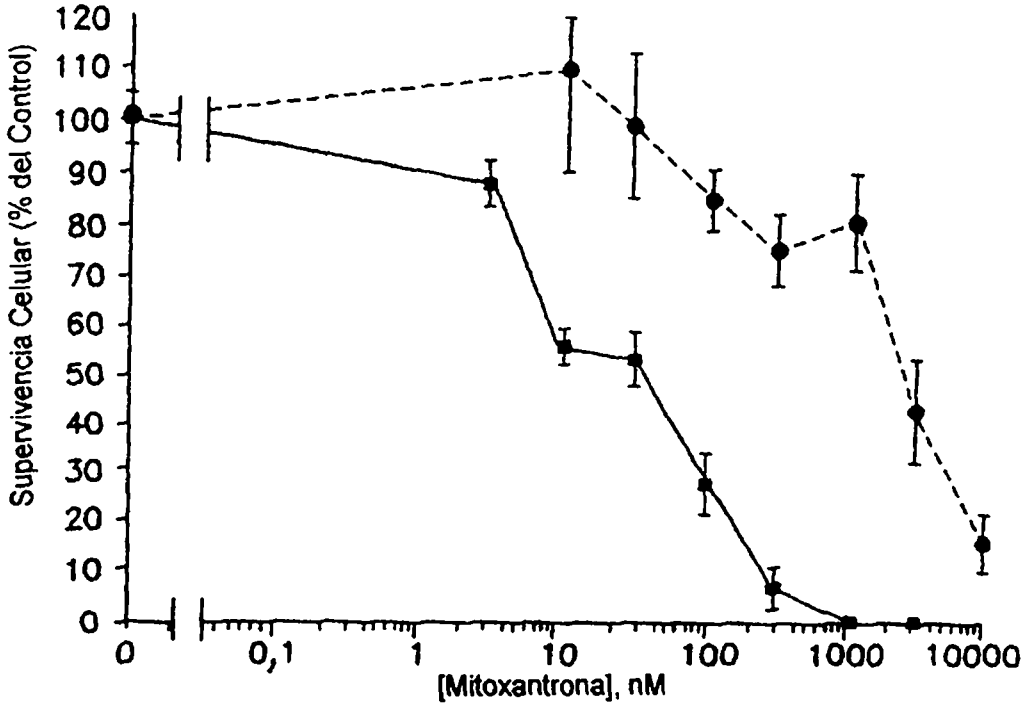


FIG. 4D-1

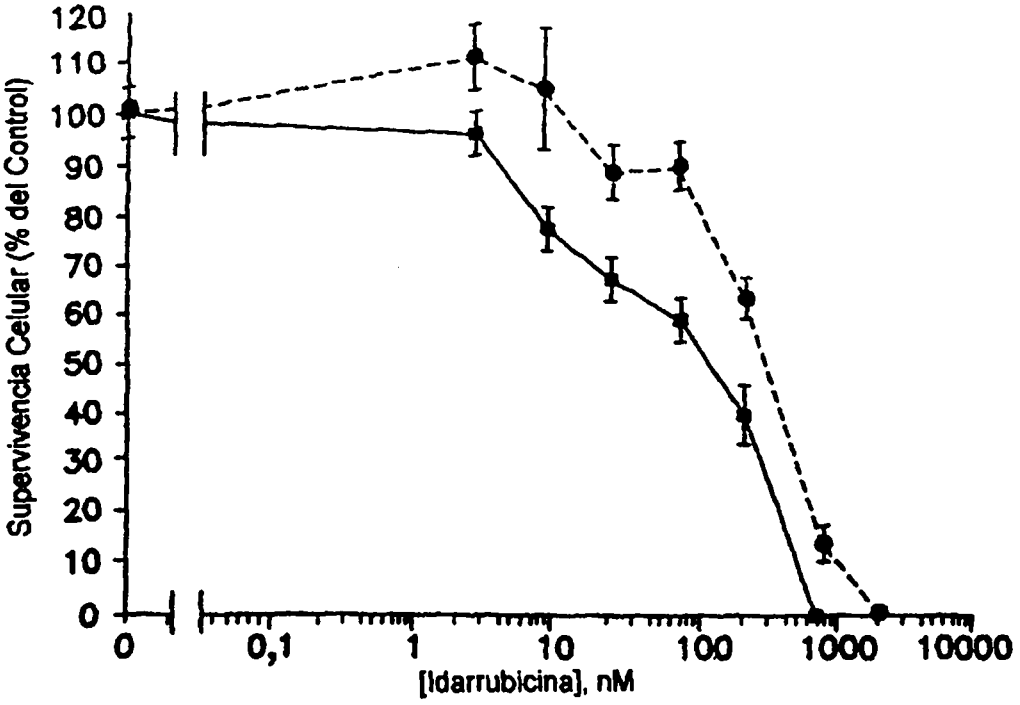


FIG. 4D-2

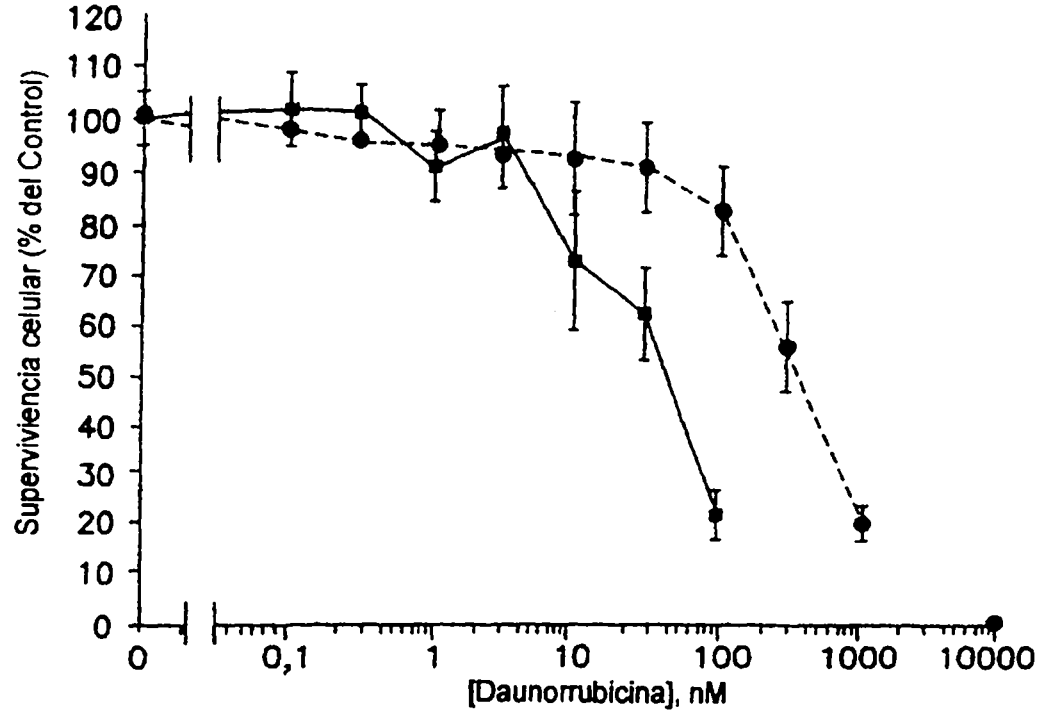


FIG. 4D-3

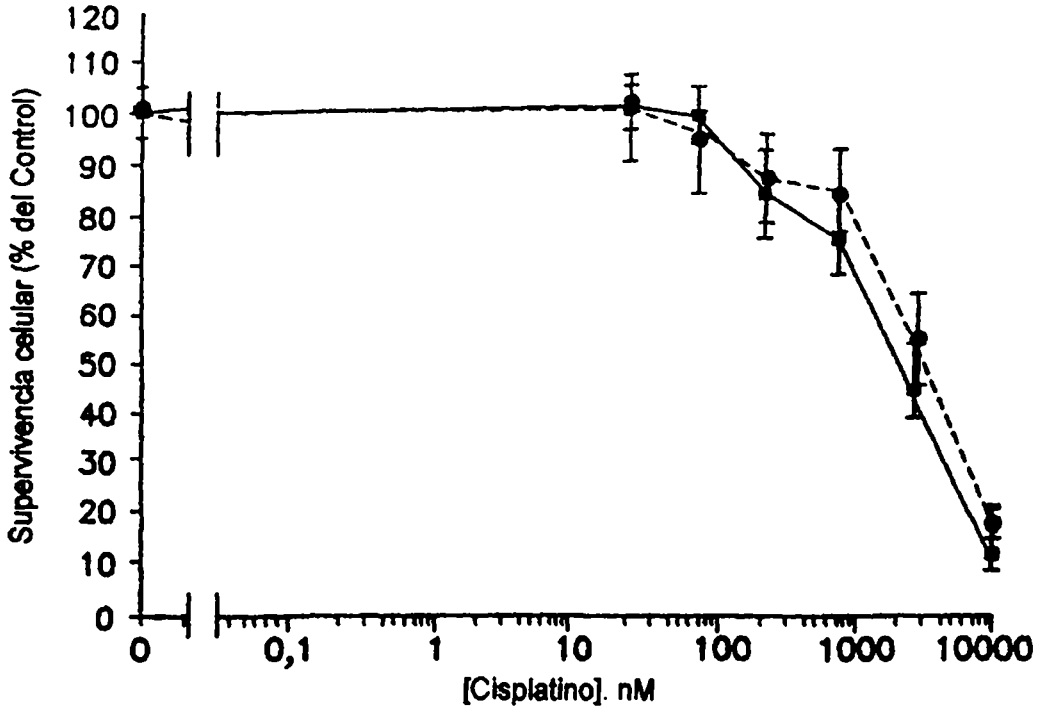


FIG. 4D-4

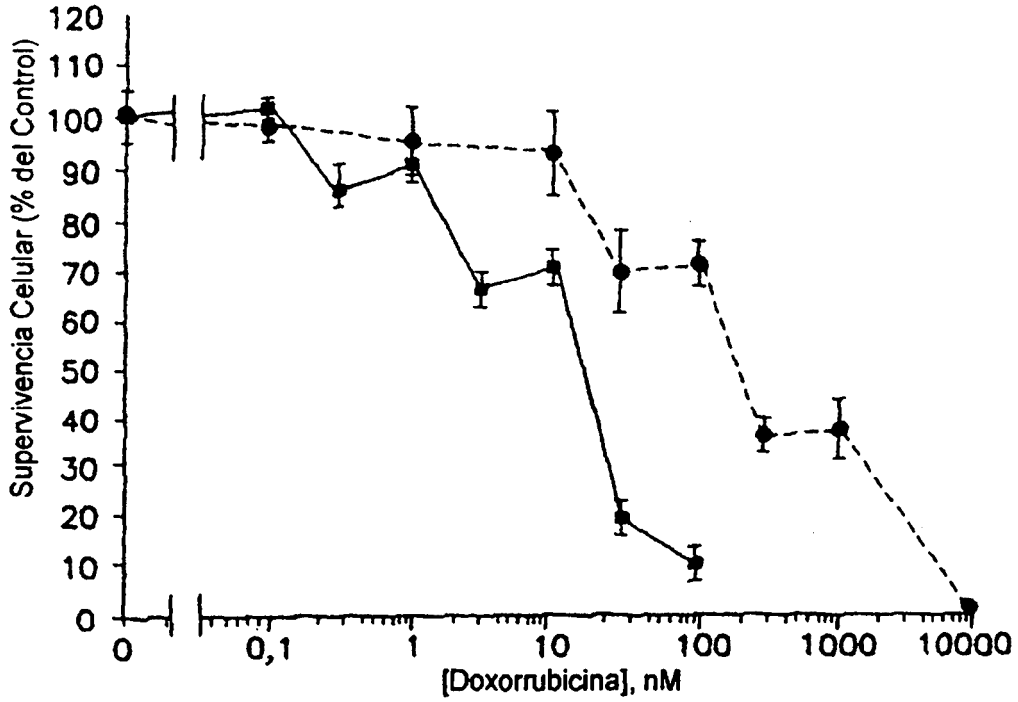


FIG. 4D-5

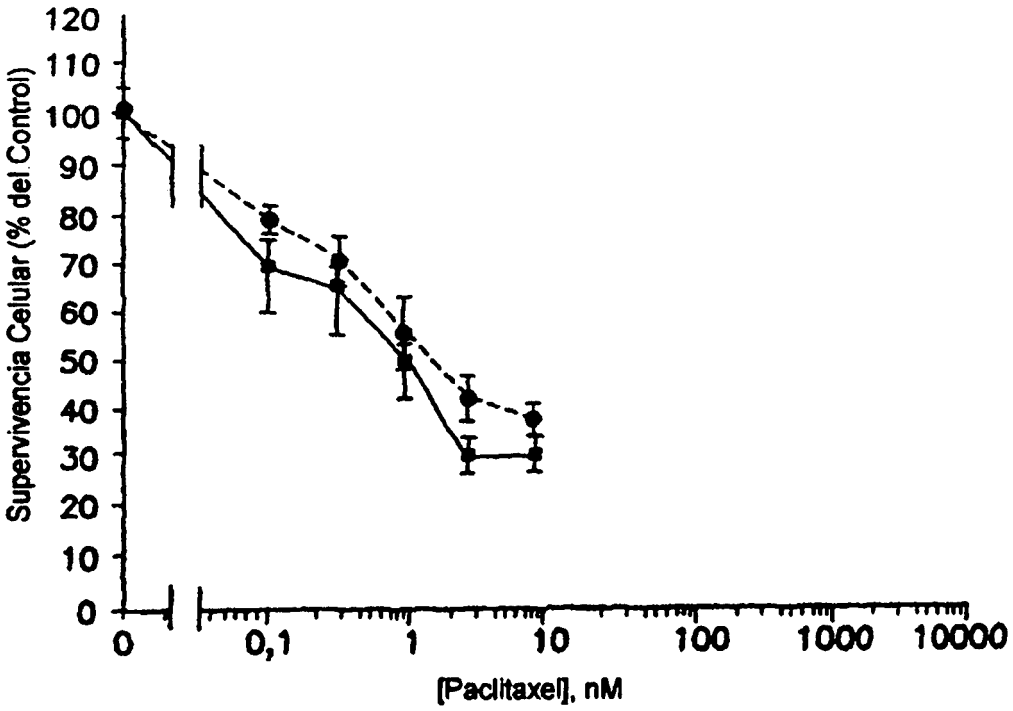


FIG. 4D-6

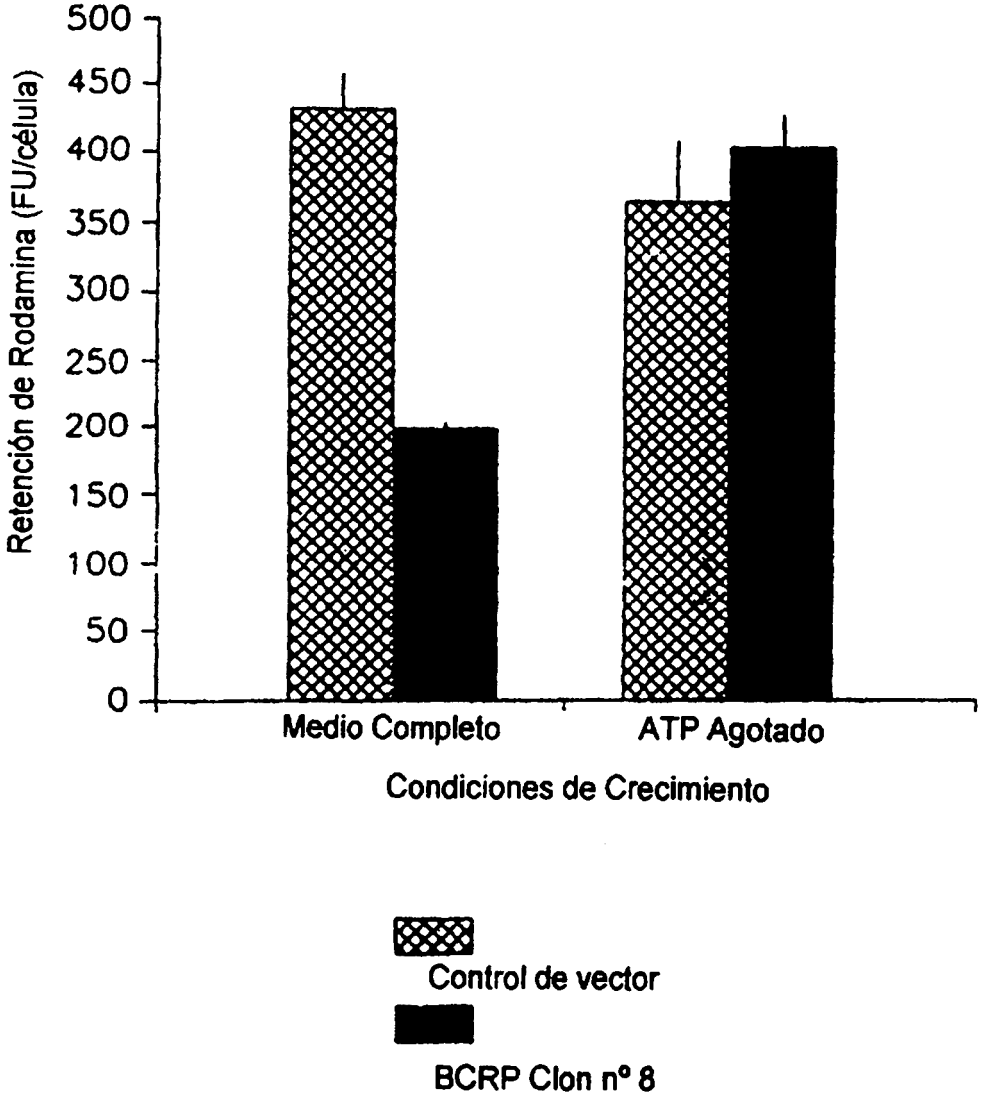

Retención de Rodamina (FU/célula)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Medio Completo
ATP Agotado
Condiciones de Crecimiento
Control de vector
BCRP Clon nº 8

FIG. 4E

LC50, nM

Línea celular	Mitoxantrona		Daunorrubicina		Doxorrubucina		Idarrubicina		Cisplatino		Paclitaxel	
	LC50	RF	LC50	RF	LC50	RF	LC50	RF	LC50	RF	LC50	RF
MCF-7/W	48	1,0	47	1,0	57	1,0	75	1,0	2.367	1,0	1,9	1,0
MCF-7/pcDNA3	54	1,1	72	1,5	66	1,2	126	1,7	3.525	1,5	3,0	1,6
MCF-7/BCRPc19	21	0,4	54	1,1	67	1,2	107	1,4	8.950	2,9	0,8	0,4
MCF-7/BCRPoII	393**	8,2	218**	4,5	254	5,2	140	1,8	3.080	1,3	1,4	0,7
MCF-7/BCRPcS	1.495**	31,2	328**	7,0	768*	9,2	285	3,5	3.700	1,6	1,8	0,9
MCF-7/AdrVp	180.000**	3333	1667**	35,5	8650**	175,0	70	0,8	4.700	2,01	2,8	1,5

* = difiere significativamente de MCF-7/W o MCF-7/pcDNA3, p <0,05 (ensayo t de Student)
** = difiere significativamente de MCF-7/W o MCF-7/pcDNA3, p <0,01 (ensayo t de Student)

FIG. 5

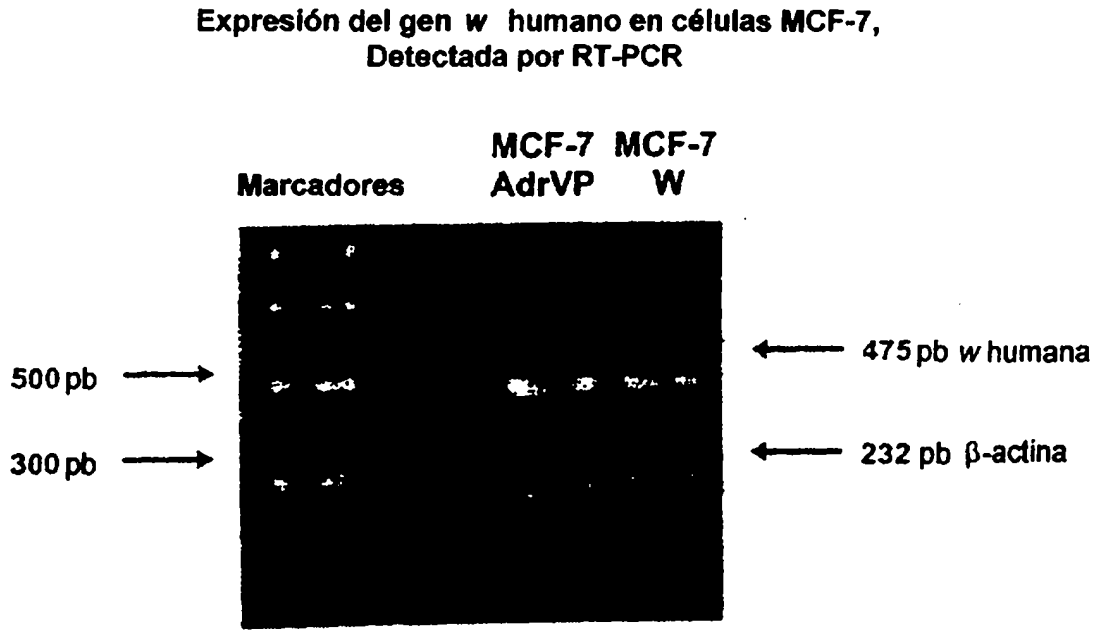

Expresión del gen w humano en células MCF-7,
Detectada por RT-PCR
Marcadores
MCF-7 AdrVP
MCF-7 W
500 pb
300 pb
475 pb w humana
232 pb β-actina

FIG. 6

Detección por RT-PCR de la expresión del ARNm de BCRP en células MCF-7/W o Células Blásticas de Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda

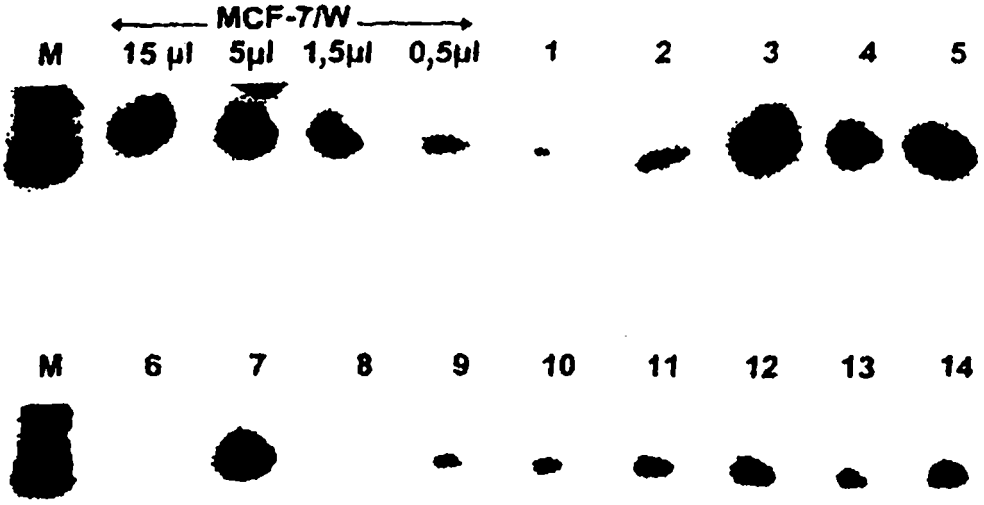


FIG. 7

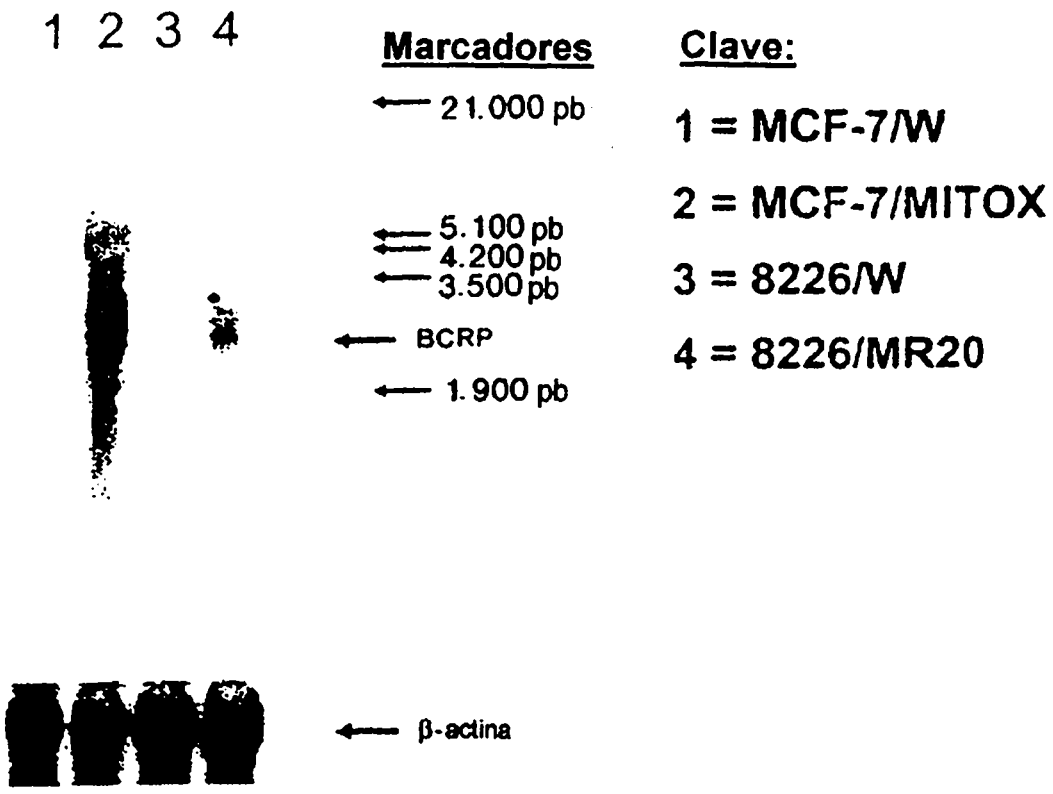

1 2 3 4
Marcadores
21.000 pb
5.100 pb
4.200 pb
3.500 pb
BCRP
1.900 pb
β-actina
Clave:
1 = MCF-7/W
2 = MCF-7/MITOX
3 = 8226/W
4 = 8226/MR20

FIG. 8A

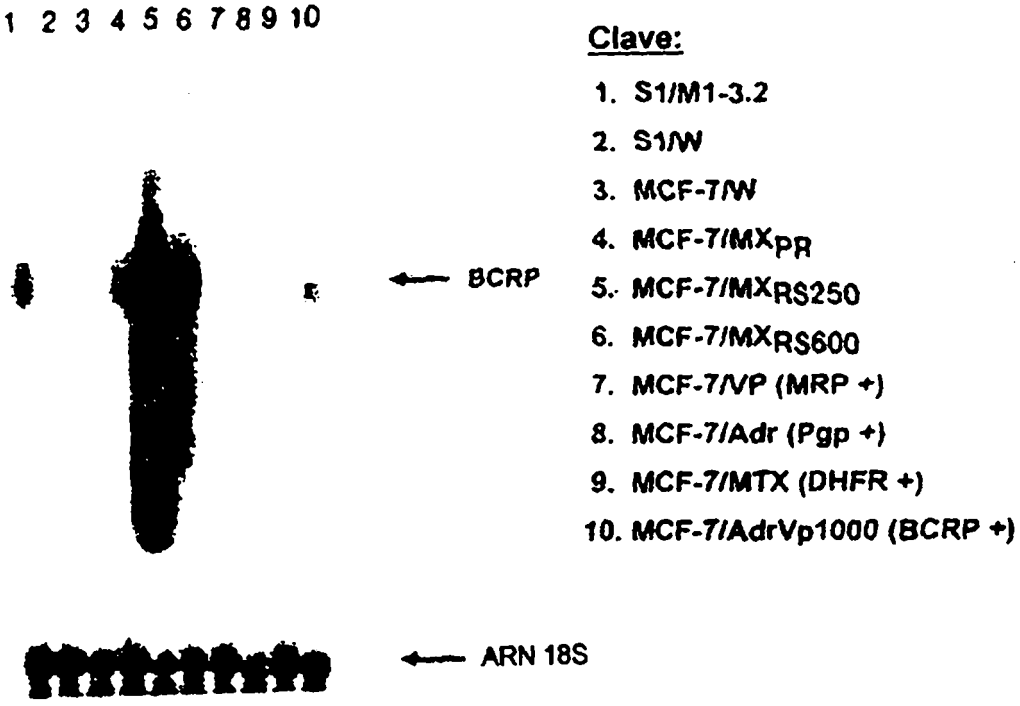

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
BCRP
ARN 18S
Clave:
1. S1/M1-3.2
2. S1/W
3. MCF-7/W
4. MCF-7/MXPR
5. MCF-7/MXRS250
6. MCF-7/MXRS600
7. MCF-7/VP (MRP +)
8. MCF-7/Adr (Pgp +)
9. MCF-7/MTX (DHFR +)
10. MCF-7/AdrVp1000 (BCRP +)

FIG. 8B

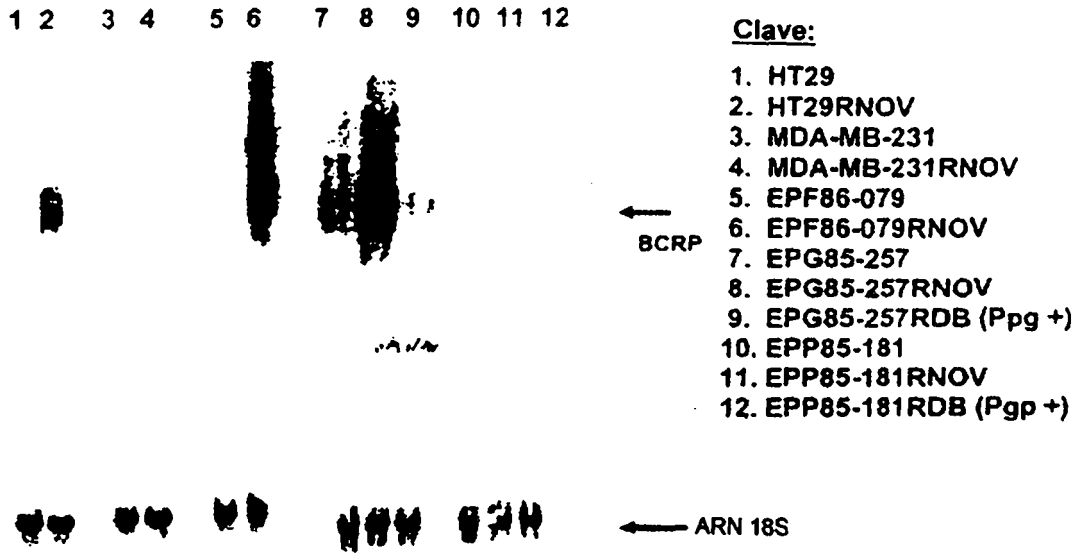
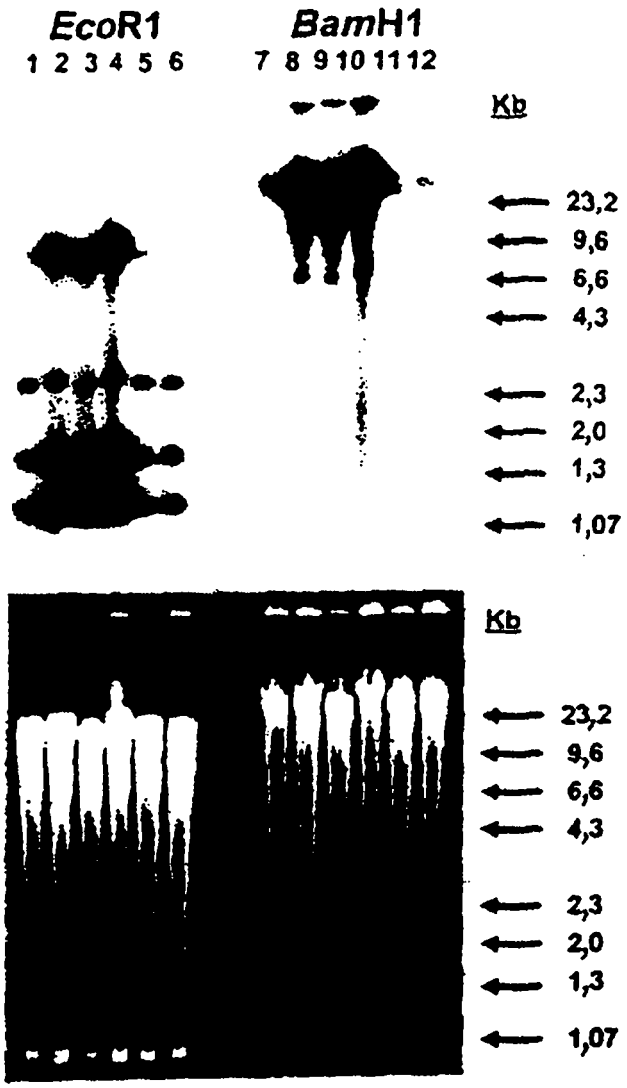

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
BCRP
ARN 18S
Clave:
1. HT29
2. HT29RNOV
3. MDA-MB-231
4. MDA-MB-231RNOV
5. EPF86-079
6. EPF86-079RNOV
7. EPG85-257
8. EPG85-257RNOV
9. EPG85-257RDB (Ppg +)
10. EPP85-181
11. EPP85-181RNOV
12. EPP85-181RDB (Pgp +)

FIG. 8C



Clave:

1, 7. MCF-7/W

2, 8. MCF-7/MX_{PR}

3, 9. MCF-7/MX_{RS250}

4, 10. MCF-7/MX_{RS600}

5, 11. MCF-7/VP (MRP+)

6, 12. MCF-7/MTX (DHFR+)

FIG. 9

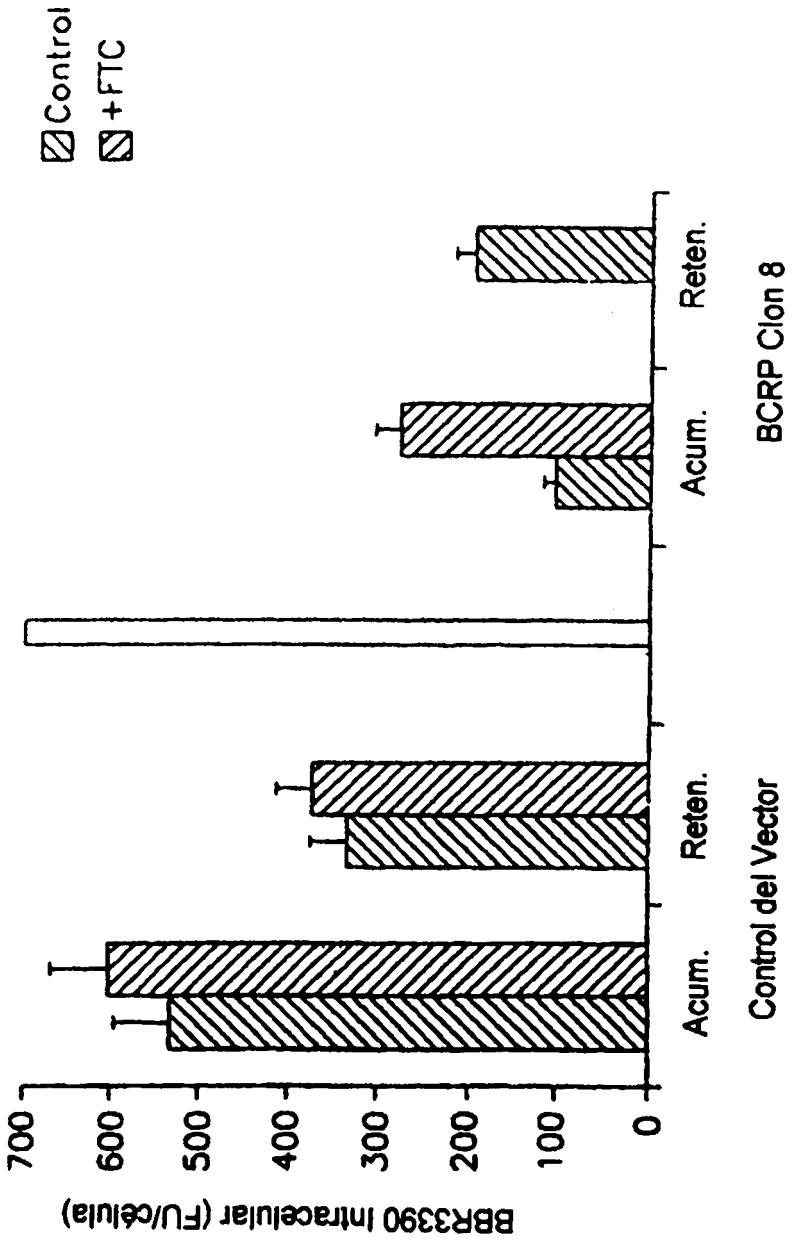

Control
+FTC
BBR3390 Intracelular (FU/célula)
700
600
500
400
300
200
100
0
Acum.
Reten.
Control del Vector
Acum.
Reten.
BCRP Clon 8

FIG. 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Doyle, L. Austin
Abrusso, Lynne V.
Ross, Douglas D.

<120> Proteína de Resistencia de Cáncer de mama (BCRP) y AND que la codifica

<130> Ross Umb conversion

<140> 011-005
<141> 05-02-1999

<150> 60/073763
<151> 05-02-1998

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 655
<212> PRT
<213> Células MCF-7/AdrVp humanas

<400> 1

```
Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn
 1               5                  10                  15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr
            20                  25                  30

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu
        35                  40                  45

Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu
    50                  55                  60

Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly
65                  70                  75                  80

Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg
                85                  90                  95

Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro
            100                 105                 110
```

Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp
115 120 125

Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala
130 135 140

Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg
145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser
165 170 175

Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys
180 185 190

Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe
195 200 205

Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val
210 215 220

Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe
225 230 235 240

Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu
245 250 255

Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu
260 265 270

Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn
275 280 285

Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala
290 295 300

Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu
305 310 315 320

Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr
325 330 335

Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu
340 345 350

Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser
355 360 365

Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser
370 375 380

Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile
385 390 395 400

Val Thr Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu
405 410 415

Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe
420 425 430

Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe
435 440 445

Val Val Glu Lys Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr
450 455 460

Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro
465 470 475 480

Met Thr Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met
485 490 495

Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr
500 505 510

Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala
515 520 525

Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys
530 535 540

Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr
545 550 555 560

Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr
565 570 575

Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys
580 585 590

Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys
595 600 605

Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp
610 615 620

Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe
625 630 635 640

Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser
645 650 655

<210> 2
<211> 2418
<212> ADN
<213> Células MCF-7/AdrVp humanas

<400> 2

gggaggaggc agcctgtgga ggaactgggt aggatttagg aacgcaccgt gcacatgctt 60
ggtggtcctg ttaagtggaa actgctgctt tagagtttgt ttggaaggtc cgggtgactc 120
atcccaacat ttacatcctt aattgtttaa gcgctgcctc cgagcgcacg catcctgaga 180
tcctgagcct ttggtttaaga ccgagctcta ttaagctgaa aagataaaaa ctctccagat 240
gtcttccagt aatgtcgaag tttttatccc agtgtcacaa ggaaacacca atggcttccc 300
cgcgacagct tccaatgacc tgaaggcatt tactgaagga gctgtgttaa gttttcataa 360
catctgctat cgagtaaaac tgaagagtgg ctttctacct tgtcgaaaac cagttgagaa 420
agaaatatta tcgaatatca atgggatcat gaaacctggt ctcaacgcca tcctgggacc 480
cacaggtgga ggcaaatctt cgttattaga tgtcttagct gcaaggaaag atccaagtgg 540
attatctgga gatgttctga taaatggagc accgcgacct gccaatttca aatgtaattc 600
aggttacgtg gtacaagatg atgttgtgat gggcactctg acggtgagag aaaacttaca 660
gttctcagca gctcttcggc ttgcaacaac tatgacgaat catgaaaaaa acgaacggat 720
taacagggtc attcaagagt taggtctgga taaagtggca gactccaagg ttggaacttca 780
gtttatccgt ggtgtgtctg gaggagaaag aaaaaggact agtataggaa tggagcttat 840
cactgatcct tccatcttgt tcttggatga gcctacaact ggcttagact caagcacagc 900
aaatgctgtc cttttgctcc tgaaaaggat gtctaagcag ggacgaacaa tcatcttctc 960
cattcatcag cctcgatatt ccatcttcaa gttgtttgat agcctcacct tattggcctc 1020
aggaagactt atgttccacg ggcctgctca ggaggccttg ggatactttg aatcagctgg 1080
ttatcactgt gaggcctata ataaccctgc agacttcttc ttggacatca ttaatggaga 1140
ttccactgct gtggcattaa acagagaaga agactttaaa gccacagaga tcatagagcc 1200
ttccaagcag gataagccac tcatagaaaa attagcggag atttatgtca actcctcctt 1260
ctacaaagag acaaaagctg aattacatca actttccggg ggtgagaaga agaagaagat 1320
cacggtcttc aaggagatca gctacaccac ctccttctgt catcaactca gatgggtttc 1380
caagcgttca ttcaaaaact tgctgggtaa tccccaggcc tctatagctc agatcattgt 1440
cacagtcgta ctgggactgg ttataggtgc catttacttt gggctaaaaa atgattctac 1500
tggaatccag aacagagctg gggttctctt cttcctgacg accaaccagt gtttcagcag 1560
tgtttcagcc gtggaactct ttgtggtaga gaagaagctc ttcatacatg aatacatcag 1620
cggatactac agagtgtcat cttattttcct tggaaaactg ttatctgatt tattacccat 1680
gacgatgtta ccaagtatta tatttacctg tatagtgtac ttcatgttag gattgaagcc 1740
aaaggcagat gccttcttcg ttatgatgtt tacccttatg atggtggctt attcagccag 1800
ttccatggca ctggccatag cagcaggtca gagtgtggtt tctgtagcaa cacttctcat 1860
gaccatctgt tttgtgttta tgatgatttt ttcaggtctg ttggtcaatc tcacaaccat 1920
tgcatcttgg ctgtcatggc ttcagtactt cagcattcca cgatatggat ttacggcttt 1980
gcagcataat gaatttttgg gacaaaactt ctgcccagga ctcaatgcaa caggaaacaa 2040
tccttgtaac tatgcaacat gtactggcga agaatatttg gtaaagcagg gcatcgatct 2100
ctcaccctgg ggcttgtgga agaatcacgt ggccttggct tgtatgattg ttatttttcct 2160
cacaattgcc tacctgaaat tgttatttct taaaaaatat tcttaaattt ccccttaatt 2220
cagtatgatt tatcctcaca taaaaaagaa gcactttgat tgaagtattc aatcaagttt 2280
ttttgttgtt ttctgttccc ttgccatcac actgttgcac agcagcaatt gttttaaaga 2340
gatacatttt tagaaatcac aacaaactga attaaacatg aaagaaccca aaaaaaaaga 2400
tatcactcag cataatga 2418

<210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

cgaccgacga cacaga

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

cttaaaatga atgcgattga t

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ttaggattga agccaaagg

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

taggcaattg tgaggaaaat a

<210> 7
<211> 795
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

tcattatgct gagtgatatc ttttttttg gaaaactgtt atctgattta ttacccatga 60
cgatgttacc aagtattata tttacctgta tagtgtactt catgttagga ttgaagccaa 120
aggcagatgc cttcttcgtt atgatgtttа cccttatgat ggtggcttat tcagccagtt 180

ccatggcact ggccatagca gcaggtcaga gtgtggtttc tgtagcaaca cttctcatga 240
ccatctgttt tgtgtttatg atgatttttt caggtctgtt ggtcaatctc acaaccattg 300
catcttggct gtcatggctt cagtacttca gcattccacg atatggattt acggctttgc 360
agcataatga atttttggga caaaacttct gcccaggact caatgcaaca ggaaacaatc 420
cttgtaacta tgcaacatgt actggcgaag aatatttggt aaagcagggc atcgatctct 480
cacctgggg cttgtggaag aatcacgtgg ccttggcttg tatgattgtt attttcctca 540
caattgccta cctgaaattg ttatttctta aaaaatattc ttaaatttcc ccttaattca 600
gtatgattta tcctcacata aaaaagaagc actttgattg aagtattcaa tcaagttttt 660
ttgttgtttt ctgttccctt gccatcacac tgttgcacag cagcaattgt tttaaagaga 720
tacatttta gaaatcacaa caaactgaat taaacatgaa agaacccaaa aaaaaagata 780
tcactcagca taatg 795