

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 317**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07802629 .1**  
96 Fecha de presentación: **15.08.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2064548**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **MÉTODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE DE UNA PROTEÍNA DE TRANSPORTE.**

30 Prioridad:  
**25.08.2006 EP 06119511**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.01.2012**

73 Titular/es:  
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH  
BINGER STRASSE 173  
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:  
**CUI, Yunhai**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 372 317 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 para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte

5 Las proteínas de transporte son proteínas membranales que regulan la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas, tales como la membrana citoplasmática o las membranas subcelulares. Las proteínas de transporte permiten el movimiento pasivo de solutos a través de la membrana bajando por sus gradientes electroquímicos (transportadores pasivos) o median en la acumulación de solutos frente a sus gradientes de concentración mediante el consumo directo o indirecto de la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP (transportadores activos). Una de las familias más grandes de transportadores activos son los transportadores de casete de unión a ATP (transportadores ABC) (Higgins, 1992; Holland y Holland, 2005). En el ser humano, los transportadores ABC desempeñan importantes funciones en una amplia variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Las mutaciones en los genes codificantes de los transportadores ABC resultan en diversas enfermedades genéticas, entre ellas la fibrosis quística (Riordan *et al.*, 1989), la enfermedad de Tangier (Bodzioch *et al.*, 1999; Brooks-Wilson *et al.*, 1999; Young y Fielding, 1999), el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1995), pseudoxantoma elástico (Ringpfeil *et al.*, 2000) y la enfermedad de Stargardt (Allikmets, 1997). Aparte de sus funciones fisiológicas, los transportadores ABC también desempeñan importantes funciones en el proceso de absorción, disposición y eliminación de fármacos (Ayrton y Morgan, 2001; Borst y Elferink, 2002). La sobreexpresión de los transportadores ABC en las células tumorales es un mecanismo importante de su resistencia a los fármacos quimioterapéuticos (Gottesman *et al.*, 2002). Por lo tanto, la investigación sobre la interacción en fármacos y transportadores ABC es indispensable para el desarrollo con éxito de los candidatos farmacológicos.

Debido a la importante función de las proteínas de transporte existe una necesidad de sustancias que puedan modular la actividad de las mismas. Para identificar dicha sustancia, existe una necesidad de, por ejemplo, un ensayo compatible de alto o ultraalto rendimiento que sea suficientemente sensible para determinar si una sustancia puede modular la actividad de las proteínas de transporte.

En la actualidad, únicamente se conocen en la técnica métodos costosos y largos que comprenden varias etapas para determinar únicamente la actividad de transporte de una proteína de transporte, lo que es el método de base para determinar si una sustancia puede modular la actividad de una proteína de transporte, por ejemplo Williams *et al.*, 2003, en donde se da a conocer un método en el que se utilizan células completas para medir la actividad de transporte de incorporación.

Un método típico para determinar la actividad de una proteína de transporte conocido de la técnica es, por ejemplo, un método de filtración rápida en el que se mide la actividad de transporte de una proteína de transporte del modo siguiente:

- se proporcionan vesículas membranales preparadas a partir de tejidos, células en cultivo o células que expresan una proteína de transporte recombinante,
- se incuban dichas vesículas durante un periodo de tiempo dado con un sustrato de marcaje radioactivo bajo condiciones que permitan el transporte del sustrato,
- se separan las vesículas membranales del sustrato extravesicular mediante filtración a través de, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o de fibra de vidrio, y
- se mide, por ejemplo, el incremento de radioactividad de las vesículas separadas, en las que el nivel de radioactividad se correlaciona directamente con la actividad de transporte de la proteína de transporte (Keppler *et al.*, 1998).

Aparte de la larga etapa de separación de dicho método, una desventaja adicional del mismo es que no resulta adecuado para las campañas de cribado de alto rendimiento (HTS) y en particular parte las campañas de cribado de ultra-alto rendimiento (uHTS). La patente WO n° 2005/C54852 da a conocer un ensayo que utiliza tecnología SPA, que es bien conocida para la utilización en los HTS. Sin embargo, dicha tecnología SPA da a conocer resulta adecuada únicamente para las proteínas transportadoras de incorporación.

Tal como se ha descrito de manera general anteriormente, los usos de las proteínas de transporte para el perfilado de sustancias durante el desarrollo de una sustancia farmacéutica están adquiriendo una importancia creciente. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar un nuevo método rápido para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte de exportación que también resulte adecuado para la utilización en campañas de HTS.

#### 60 Descripción de la invención

Aunque las proteínas de transporte y su aplicabilidad al perfilado de sustancias putativas y, de esta manera, la necesidad de métodos para determinar la actividad de una proteína de transporte respectiva, se han conocido desde hace años, hasta hoy sólo se han conocido métodos largos para determinar la actividad de transporte de una

proteína de transporte que comprenden una etapa de filtración fuera de la probeta en la que debe separarse el sustrato marcado respecto de la mezcla de reacción antes de obtener la correspondiente lectura, o métodos restringidos a proteínas transportadoras de incorporación.

5 Sin embargo, la presente invención proporciona por primera vez un "método en un solo tubo", que proporciona un método rápido y menos generador de residuos para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte ABC (proteína de transporte de exportación), que además resulta adecuada en las campañas de HTS, así como de uHTS. Uno de los fundamentos de para la presente invención es el resultado de que puede marcarse un segmento muy próximo al extremo C-terminal, es decir 1 a 25 aminoácidos de una proteína de transporte ABC, por ejemplo con una etiqueta de histidina (Hagmann *et al.*, 1999) y/o dirigirse, por ejemplo con un anticuerpo o fragmento del mismo, sin perder su actividad de transporte. De esta manera, puede utilizarse el mismo extremo C-terminal como anclaje en un ensayo para determinar la actividad de dicha proteína de transporte.

15 Un fundamento adicional es una técnica de ensayo homogénea y genérica bien conocida denominada técnica de centelleo por proximidad (SPA), que se remonta, por ejemplo, a 1979 (Hart y Greenwald, *Mol. Immunology* 16:265-267, 1979). Puede utilizarse la SPA para medir la radioactividad mediante la proximidad de la radioactividad a un líquido de centelleo que puede ser estimulado a emitir luz que puede detectarse en contadores de centelleo estándares. Al desintegrarse un átomo radioactivo, libera partículas subatómicas, tales como electrones. La distancia a la que viajarán estas partículas dentro de agua es limitada y depende de la energía de la partícula. La SPA se basa en esta limitación. Por ejemplo, al desintegrarse un átomo de tritio, [<sup>3</sup>H], libera una partícula β.

20 En el caso de que el átomo de [<sup>3</sup>H] se encuentre a menos de 1,5 μm de una molécula de líquido de centelleo adecuada, la energía de la partícula β será suficiente para alcanzar el líquido de centelleo y excitarlo para que emita luz.

25 En el caso de que la distancia entre el líquido de centelleo y el átomo de [<sup>3</sup>H] sea superior a 1,5 μm, las partículas β no presentarán suficiente energía para viajar las distancias necesarias. En una solución acuosa, las colisiones con las moléculas de agua disipan la energía de las partículas β y por lo tanto no pueden estimular el líquido de centelleo. Preferentemente, el líquido de centelleo se incorpora en pequeñas fluoromicroesferas (perlas) que son bien conocidas de la técnica. Se construyen para unirse a moléculas específicas (por ejemplo recubiertas con proteína A para unirse a una inmunoglobulina). En el caso de que una molécula radioactiva se una a una perla, se encontrará suficientemente próxima para que pueda estimular al líquido de centelleo para que emita luz (longitud de onda de entre 350 y 650 nm) que puede detectarse en contadores de centelleo estándares como TopCount (Perkin Elmer) o LEADSeeker (GE). La presente invención proporciona por primera vez un ensayo de SPA para determinar la actividad de una proteína de transporte ABC en la que el mismo extremo C-terminal de una proteína de transporte se utiliza como puente para proporcionar proximidad a una perla de SPA.

40 Un método de la presente invención para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte ABC se caracteriza porque el método comprende:

- mezclar:

45 (i) una vesícula dentro-fuera ("inside-out") que porta por lo menos una proteína de transporte ABC de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula con:

(ii) una perla de SPA adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte con:

50 (iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte (es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos) con:

(iv) un sustrato marcado radioactivamente según la invención que puede ser transportado por la proteína de transporte bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato (es decir, en presencia de ATP), y

55 - incubar la mezcla durante un periodo de tiempo suficientemente prolongado para permitir la unión directa o indirecta de las vesículas con la perla de SPA y para permitir el transporte de sustrato al interior de la vesícula, y

- medir la luz emitida por el líquido de centelleo de la perla.

60 Un método adicional de la presente invención es un método para determinar si un compuesto es un modulador de la actividad de transporte de una proteína de transporte ABC, caracterizado porque el método comprende:

- mezclar:

(A)

(i) una vesícula dentro-fuera que porta por lo menos una proteína de transporte ABC de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula con:

5 (ii) una perla de SPA adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte con:

10 (iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte (es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos) con:

(iv) un sustrato marcado radioactivamente según la invención que puede ser transportado por la proteína de transporte bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato (es decir, en presencia de ATP), con

15 (v) un compuesto que debe someterse a ensayo, y mezclar:

(B)

(i) una vesícula, preferentemente una vesícula dentro-fuera que porta por lo menos una proteína de transporte de un modo en que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula, con (ii) una perla de SPA adecuada para la unión directa o indirecta con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte, con:

20 (iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte (es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos) con:

25 (iv) un sustrato marcado radioactivamente según la invención que puede ser transportado por la proteína de transporta bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato (es decir, en presencia de ATP), y

- incubar las mezclas (A) y (B) durante un periodo de tiempo suficientemente prolongado para permitir la unión directa o indirecta de las vesículas con la perla de SPA y para permitir el transporte de sustrato al interior de la vesícula, y

30 - medir la luz emitida por el líquido de centelleo de la perla, en donde el valor incrementado obtenido con (A), en comparación con (B), identifica un compuesto que es un activador de la proteína de transporte sometida a ensayo, y un valor reducido obtenido con (A), en comparación con (B), identifica un compuesto que es un inhibidor de la proteína de transporte sometida a ensayo.

35 Todos los métodos de la presente invención pueden utilizarse en un cribado de alto rendimiento (HTS), así como en una campaña de ultra-HTS (uHTS). Dicho puede puede llevarse a cabo mediante la utilización de una placa que presente por lo menos 96 pocillos, más preferentemente se utiliza una placa de 384 pocillos o una placa de 1.536 pocillos. También resulta preferente la utilización de un chip a modo de plataforma de reacción y/o lectura.

40 Se da a conocer adicionalmente un kit para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte y para determinar si una sustancia es un modular, es decir un activador o un inhibidor, de una proteína de transporte de la presente invención.

45 Un kit de la presente invención para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte comprende:

(a) una vesícula, preferentemente una vesícula dentro-fuera, que porta por lo menos una proteína de transporte de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula,

50 (b) una perla de SPA adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte.

El término "mezclar" según los métodos de la presente invención debe entenderse como por lo menos cualquier adición de los ingredientes mencionados. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el término "mezclar" también puede incluir cualquier movimiento o agitación que pueda conducir a una distribución adicional de dichos ingredientes.

60 Una vesícula dentro-fuera de la presente invención es una vesícula que consiste de una membrana de bicapa lipídica. Una vesícula dentro-fuera es una vesícula en la que la superficie de la misma que anteriormente era intracelular, ahora se encuentra orientada hacia el exterior de la vesícula, y la superficie de la misma que anteriormente era extracelular, ahora se encuentra orientada hacia el interior de la vesícula. Este tipo de vesícula se forma espontáneamente durante la preparación de las membranas celulares. La lateralidad de las vesículas membranales (superficie correcta exterior o superficie interior hacia el exterior) puede determinarse mediante un método bien conocido de la técnica, por ejemplo midiendo la actividad de un ectoenzima, tal como la nucleótido

pirofosfatasa (EC 3.6.1.9) en presencia o no de Triton X-100 (Keppler *et al.*, 1998; Meier y Boyer, 1990).

Una proteína de transporte de la presente invención, una proteína de transporte ABC, es cualquier proteína natural o originada a partir de la expresión recombinante en una vesícula celular, membrana celular o membrana celular de la célula, que permite el transporte de un sustrato a través de la membrana de la vesícula, así como cualquier proteína de transporte ABC similar que ha sido modificada en el extremo C-terminal de manera que una molécula adicional puede unirse específicamente a la parte modificada del extremo C-terminal, por ejemplo se ha fusionado una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal. Una proteína de transporte ABC preferente (Holland y Holland, 2005) se selecciona de entre un grupo que consiste de MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8, SUR1, SUR2, CFTR, ABCA1, ABCA3, ABCA4, ABCG5, ABCG8, MDR1, MDR3, BSEP, BCRP, TAP1 y TAP2, que son bien conocidos de la técnica. Sin embargo, en la sección de referencias, a continuación, y en los números de acceso de las mismas, se mencionan:

ID de proteína/acróónimo del gen; Referencia; nº de acceso

MRP1 / ABC1; (Cole *et al.*, 1992); NP\_004987  
 MRP2 / ABCC2; (Buchler *et al.*, 1996); NP\_000383  
 MRP3 / ABCC3; (Kiuchi *et al.*, 1998); NP\_003777  
 MRP4 / ABCC4; (Lee *et al.*, 1998); NP\_005836  
 MRP5 / ABCC5; (Belinsky *et al.*, 1998); NP\_005679  
 MRP6 / ABCC6; (Kool *et al.*, 1999); NP\_001162  
 CFTR / ABCC7; (Riordan *et al.*, 1989); NP\_000483  
 SUR1 ABC8; (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995); NP\_000343  
 SUR2 / ABC9; (Inagaki *et al.*, 1996); NP\_005682; NP\_064693; NP\_064694  
 MRP7 / ABCC10; (Hopper *et al.*, 2001); NP\_258261  
 MRP8 / ABCC11; (Tammur *et al.*, 2001); NP\_115972; NP\_149163; NP\_660187  
 MDR1 / ABC81; (Gros *et al.*, 1986); NP\_000918  
 TAP1 / ABCB2; (Trowsdale *et al.*, 1990); NP\_000584  
 TAP2 / ABCB3; (Trowsdale *et al.*, 1990); NP\_000535; NP\_061313  
 MDR3 ABC4; (Van der Blik *et al.*, 1987); NP\_000434; NP\_061337; NP\_061338  
 BSEP / ABCB11; (Strautnieks *et al.*, 1998); NP\_003733  
 ABCA1; (Luciani *et al.*, 1994); NP\_005493  
 ABCA3; (Klugbauer and Hofmann, 1996); NP\_001080  
 ABCA4; (Allikmets, 1997); NP\_000341  
 BCRP / ABCG2; (Allikmets *et al.*, 1998); NP\_004818  
 ABCG5; (Berge *et al.*, 2000); NP\_071881  
 ABCG8; (Berge *et al.*, 2000); NP\_071882

La proteína de transporte según la invención es una proteína capaz de transportar un sustrato según la invención desde el exterior hasta el interior de una vesícula según la invención.

Un extremo muy C-terminal de una proteína de transporte de la presente invención es el extremo mismo de una proteína de transporte según la presente invención, comprendiendo preferentemente un tramo de entre por lo menos 6 y como máximo 25 aminoácidos del extremo C-terminal mismo de una proteína de transporte según la presente invención. Dicho péptido que consiste de los aminoácidos de dicho tramo puede utilizarse según la presente invención para generar anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden unirse a dicho péptido y, de esta manera, pueden unirse al extremo C-terminal mismo de una proteína de transporte según la presente invención y pueden utilizarse para mediar en la unión indirecta de una perla de SPA según la invención a un extremo muy C-terminal según la invención. A título de ejemplo, dos péptidos que consisten de aminoácidos de un tramo de entre 15 y 25 aminoácidos de MRP4 se proporcionan en SEC ID nº 1 y 2, respectivamente.

Una actividad de una proteína de transporte ABC de la presente invención es toda actividad de una proteína de transporte ABC según la invención que resulta en una alteración espacial de un sustrato según la presente invención, preferentemente en un traslado de un sustrato según la invención hasta el interior de una vesícula según la invención. Dicha actividad puede determinarse mediante un método según la invención.

Una perla de SPA de la presente invención es toda perla de SPA que puede unirse directa o indirectamente al extremo C-terminal mismo de una proteína de transporte según la invención. Una unión indirecta según la invención es una unión que se encuentra mediada por una molécula soluble adicional que puede ser un anticuerpo (primer anticuerpo) que puede, por una parte, unirse al extremo C-terminal mismo de una proteína de transporte según la invención y que puede, por otra parte, unirse a una perla de SPA, por ejemplo mediante proteína A (la proteína A es una proteína aislada a partir de la pared celular de algunas cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus* y que se caracteriza por su capacidad de unirse a la IgG de la mayoría de especies de mamífero) o mediante un anticuerpo adicional que ha sido acoplado a la perla de SPA y que es capaz de unirse al primer anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anticabra, antirata o antiratón que sea capaz de unirse con inmunoglobulinas procedentes de conejo,

cabra, rata o ratón, respectivamente). En este caso, la perla de SPA preferentemente se recubre con proteína A, o un segundo anticuerpo correspondiente. Una unión directa según la invención es una unión en la que no resulta necesaria ninguna molécula soluble adicional; por ejemplo, dicha unión puede ser una unión de la proteína de transporte según la presente invención a una perla de SPA que ha sido recubierta de manera que la unión con el extremo C-terminal mismo o un extremo muy C-terminal modificado resulta posible, por ejemplo una proteína de transporte según la presente invención al extremo C-terminal de la cual se ha fusionado una etiqueta de histidina se une directamente a una perla de SPA que ha sido recubierta con quelato de cobre. Puede determinarse fácilmente una cantidad adecuada de perlas de SPA mediante métodos comúnmente conocidos de la técnica. Sin embargo, resultan preferentemente adecuadas cantidades de entre 20 y 250 µg/pocillo de una placa de 384 pocillos.

Un anticuerpo que puede unirse al extremo C-terminal de una proteína de transporte de la presente invención es cualquier anticuerpo (Ab) de un suero policlonal, por ejemplo suero de conejo, o cualquier anticuerpo monoclonal (mAb) que pueda unirse al extremo C-terminal de una proteína de transporte según la presente invención. Dicho anticuerpo de la invención puede obtenerse fácilmente mediante métodos conocidos de la técnica, es decir, mediante inmunización de un animal no humano respectivo mediante la administración de por lo menos un extremo C-terminal de una proteína de transporte de la invención. Puede someterse a ensayo fácilmente mediante métodos bien conocidos de la técnica la posibilidad de utilización en un método de la invención de dicho Ab procedente de un suero policlonal o mAb, los cuales permiten determinar si un mAb o un Ab de un suero policlonal pueden unirse, preferentemente si pueden unirse selectivamente, al tramo de entre 15 y como máximo 25 aminoácidos del extremo muy C-terminal de la proteína de transporte de la invención. Según la presente invención, debe entenderse que un Ab o mAb adecuado de la presente invención no se une a un dominio de aminoácidos diferente que se encuentre: (i) en el exterior de una vesícula en el caso de que ésta se encuentre integrado en la membrana de dicha vesícula y que se encuentre: (ii) cadena arriba de dichos 25 aminoácidos del extremo C-terminal de una proteína de transporte de la presente invención.

Una etiqueta de histidina según la presente invención es un péptido que consiste de residuos histidina, preferentemente de por lo menos 6 residuos histidina. Se introduce en el mismo extremo de la proteína de transporte según la presente invención mediante, por ejemplo, la inserción de una secuencia de ADN codificante de los residuos histidina delante del codón de parada del ADNc de longitud completa de la proteína de transporte. Otros métodos para conseguir dicha etiqueta son bien conocidos de la técnica.

Un sustrato de la presente invención es cualquier molécula o compuesto químico u oligopéptido o ácido nucleico o nucleótido o nucleótido cíclico endógeno que pueda ser transportado por una proteína de transporte según la presente invención. Dicho transporte según la presente invención es cualquier alteración espacial de un sustrato de la invención causada por una proteína de transporte que habitualmente se encuentra integrada en una bicapa lipídica.

Un sustrato preferente se selecciona de entre un grupo que consiste de: ADP, BQ-123, colesterol, cimetidina, colchicina, AMP cíclico, GMP cíclico, sulfato de deshidroepiandrosterona, daunomicina, digoxina, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, etopósido, ácido fólico, glucosilceramida, glucoquenodesoxicolato, glicocolato, leucotrieno C4, leucotrieno D4, leucotrieno E4, metotrexato, mitoxantona, sulfobromoftaleína, paclitaxel, factor activador de plaquetas, prostaglandina E1, prostaglandina E2, prostaglandina F2-alfa, ritonavir, saquinavir, tromboxano B2, verapamil, sitosterol, tauroquenodesoxicolato, taurocolato, tauroursodesoxicolato, prazosina, vincristina y vinblastina. Las combinaciones más preferentes de una proteína de transporte y un sustrato son las siguientes:

#### ID de proteína/acrónimo del gen con sustrato (Referencias)

MRP1 / ABCC1 :	leucotrieno C4, leucotrieno D4, leucotrieno E4, glucurónido de estradiol, ácido fólico o metotrexato (Jedlitschky <i>et al.</i> , 1996; Keppler <i>et al.</i> , 1998; Leier <i>et al.</i> , 1994)
MRP2 / ABCC2 :	leucotrieno C4, glucurónico de estradiol, ácido fólico, metotrexato o sulfobromoftaleína (Bakos <i>et al.</i> , 2000; Cui <i>et al.</i> , 1999; Cui <i>et al.</i> , 2001; Hooijberg <i>et al.</i> , 1999; Hooijberg <i>et al.</i> , 2003)
MRP3 / ABCC3 :	leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, ácido fólico, metotrexato o glicocolato (Hooijberg <i>et al.</i> , 2003; Zeng <i>et al.</i> , 2000)
MRP4 / ABCC4 :	Leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, sulfato de deshidroepiandrosterona, ácido fólico, GMPc, AMPc, ADP, metotrexato, prostaglandina E1, prostaglandina E2, prostaglandina F2-alfa o tromboxano B2 (Chen <i>et al.</i> , 2001; Chen <i>et al.</i> , 2002; Jedlitschky <i>et al.</i> , 2004; Reid <i>et al.</i> , 2003; Rius <i>et al.</i> , 2003; Rius <i>et al.</i> , 2005; van Aubel <i>et al.</i> , 2002; Zelcer <i>et al.</i> , 2003)
MRP5 ABC5 :	ácido fólico, GMPc, AMPc, metotrexato, 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato, 5-fluoro-uridina 5'-monofosfato ó 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (Pratt <i>et al.</i> , 2005; Wielinga <i>et al.</i> , 2005)

MRP6 / ABCC6 :	leucotrieno C4 ó BQ-123 (Ilias <i>et al.</i> , 2002; Madon <i>et al.</i> , 2000)
CFTR / ABCC7 :	cloruro (Berget <i>et al.</i> , 1991)
MRP7 / ABCC10 :	leucotrieno C4, glucurónido de estradiol (Chen <i>et al.</i> , 2003a)
MRP8 / ABCC11 :	AMPc, GMPc, leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, sulfato de deshidroepiandrosterona, taurocolato o glicocolato (Bortfeld <i>et al.</i> , 2006; Chen <i>et al.</i> , 2005)
MDR1 / ABCB1 :	glucosilceramida, factor activador de plaquetas, daunomicina, digoxina, colchicina, etopósito paclitaxel, verapamil, vincristina, vinblastina, ritonavir o saquinavir (Raggers <i>et al.</i> , 1999; Raggers <i>et al.</i> , 2001; Sarkadi <i>et al.</i> , 1992; Takeuchi <i>et al.</i> , 2006; Tanigawara <i>et al.</i> , 1992)
BSEP / ABCB11 :	taurocolato, glicocolato, tauroquenodesoxicolato, glicoquenodesoxicolato, o tauroursodesoxicolato (Byrne <i>et al.</i> , 2002; Noe <i>et al.</i> , 2002)
ABCA4 :	retinal (Sun <i>et al.</i> , 1999)
BCRP / ABCG2 :	estrona-3-sulfato, glucurónido de estradiol, ácido fólico, metotrexato, mitoxantona, topotecán o cimetidina (Chen <i>et al.</i> , 2003b; Imai <i>et al.</i> , 2003; Pavek <i>et al.</i> , 2005; Volk y Schneider, 2003)
ABCG5 :	colesterol o sitosterol (Wang <i>et al.</i> , 2006)
ABCG8 :	colesterol o sitosterol (Wang <i>et al.</i> , 2006)

El sustrato de la invención se encuentra marcado radioactivamente. Son isótopos adecuados H<sup>3</sup>, S<sup>35</sup>, P<sup>32</sup> ó <sup>35</sup>, I<sup>125</sup> (este listado únicamente da a conocer isótopos adecuados y en modo alguno debe entenderse como limitativa). Una concentración adecuada de un sustrato marcado radioactivamente puede determinarse fácilmente mediante métodos comúnmente conocidos de la técnica. Sin embargo, son preferentemente adecuadas las concentraciones de entre 1 y 1.000 µM.

El periodo de incubación de la presente invención es de por lo menos 30 segundos. Preferentemente, un periodo de incubación presenta una duración mínima de 30 segundos y máxima de 30 horas. Un periodo de incubación más preferente presenta una duración mínima de 1 hora y máxima de 24 horas. Preferentemente, las señales luminiscentes se miden inmediatamente después del final del periodo de incubación, que pueden medirse fácilmente tras 0,5, 1, 2, 4, 6 horas o como máximo 24 horas. Un periodo de incubación adecuado para cada proteína de transporte según la invención puede ser fácilmente identificado por un experto en la materia mediante la medición de una señal luminiscente en diferentes puntos temporales y posteriormente comparando los datos obtenidos. Los periodos de incubación preferentes son aquellos que, por ejemplo, proporcionan datos significativos en el periodo de tiempo más corto.

Un compuesto que debe someterse a ensayo según la presente invención para identificarlo como modulador de una proteína de transporte según la presente invención es cualquier molécula química pequeña, péptido o anticuerpo.

Un modulador de una proteína de transporte de la presente invención no influye sobre la actividad de transporte de una proteína de transporte según la presente invención. Dicho modulador es un inhibidor de una proteína de transporte de la invención o un activador de una proteína de transporte de la invención. Dicho inhibidor no reduce o inhibe la actividad de transporte de una proteína de transporte de la invención, mientras que dicho activador incrementa la actividad de transporte de una proteína de transporte de la invención.

La presente invención también da a conocer moduladores de una proteína de transporte según la presente invención que se ha determinado que son inhibidores utilizando un método según la presente invención, tales como, por ejemplo, MK571 o dipiridamol, que son inhibidores de MRP4 (van Aubel *et al.*, 2002).

Los Ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo de la presente invención; sin embargo, no deben interpretarse como limitativos. Sin embargo, los Ejemplos describen las realizaciones más preferentes de la invención.

### 35 Ejemplos:

#### Ejemplo 1:

40 1) Se prepararon vesículas membranales procedentes de células de insecto (Hi5 ó Sf9) infectadas por un constructo baculovírico que contiene el ADNc de longitud completa codificante de MRP4 tal como describen van Aubel *et al.* (van Aubel *et al.*, 2002) con algunas modificaciones: se cultivaron células Hi5 en suspensión hasta una densidad celular de 1x10<sup>6</sup> células/ml en medio de células de insecto libre de suero Insect-Xpress y se infectaron con constructo baculovírico que contenía el ADNc de longitud completa codificante de MRP4. Tres días después de la infección, se recogieron las células mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet celular en tampón hipotónico (EDTA 0,1 mM, Tris 1 mM, HEPES 1 mM, pH=7,4) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (por ejemplo Complete, Roche Diagnostics, n° de

artículo 04693132001) y se agitaron en un baño de hielo durante 90 minutos. Las células rotas se precipitaron mediante centrifugación a 4°C y 100.000 g durante 30 minutos. El pellet, consistente de fracciones membranales crudas, se resuspendió en tampón Tris/sacarosa (Tris 10 mM, sacarosa 250 mM, pH=7,4) y se homogeneizó mediante 30 golpes en un Dounce de vidrio con un mazo de mortero ajustado. Se determinó la concentración de proteínas de la preparación de membranas mediante métodos estándares, por ejemplo el ensayo BCA de proteínas (Pierce, número de producto 23250).

2) Determinación de la actividad de transporte de MRP4: se diluyeron las membranas vesiculares preparadas en 1) en tampón de Tris/sacarosa hasta una concentración de 3,3 µg de proteína/µl. Se añadieron 5 µl de las vesículas membranas diluidas a cada pocillo de una microplaca opaca blanca de 384 pocillos (Perkin Elmer, número de producto 6007299). Se añadieron 5 µl de un compuesto de ensayo (diluido en tampón de Tris/sacarosa hasta diferentes concentraciones) a las membranas vesiculares. Se preparó una mezcla de reacción que contenía ATP 12 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, fosfocreatina 30 mM y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 22,5 mM, creatina quinasa 0,375 mg/ml ((Leier *et al.*, 1994), Roche Diagnostics, nº de artículo 1012756600), ácido fólico 90 µM, ácido fólico-<sup>3</sup>H 0,1 µCi (Movarek Biochemicals, MT783), 120 µg de perlas de obtención de imágenes de SPA-proteína A o perlas de centelleo SPA-proteína A (Matsumura *et al.*, 1992) y 0,075 µl de antisuero de conejo anti-MRP4 (dirigido contra los 15 aminoácidos C-terminales de MRP4 tal como se proporcionan en SEC ID nº 1:) en tampón de Tris/sacarosa. Se inició el transporte mediante la adición de 5 µl de mezcla de reacción a las membranas vesiculares. Se midieron las señales de luminiscencia con el sistema LEADSeeker o TopCount tras 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas o como máximo 24 horas.

3) Cálculo del efecto de inhibición de un compuesto de ensayo: Se calcularon las actividades de transporte relativas de MRP4 en presencia de un compuesto de ensayo como porcentaje de la luminiscencia determinada en presencia del compuesto de ensayo en comparación con la luminiscencia determinada en ausencia del compuesto de ensayo. Un inhibidor de MRP4 resultará en valores inferiores al 100%, mientras que un activador de MRP4 resultará en valores superiores al 100%.

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos mediante la utilización del ensayo descrito anteriormente y sometiendo a ensayo inhibidores de MRP4 conocidos.

	IC <sub>50</sub> [mM]
Dipiridamol (van Aubel <i>et al.</i> , 2002)	35
MK571 (van Aubel <i>et al.</i> , 2002)	3,6

## 30 REFERENCIAS

1. Aguilar-Bryan,L., Nichols,C.G., Wechsler,S.W., Clement,J.P., Boyd,A.E., III, Gonzalez,G., Herrera-Sosa,H., Nguy,K., Bryan,J., and Nelson,D.A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.
2. Allikmets,R. (1997). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 17, 122.
3. Allikmets,R., Schriml,L.M., Hutchinson,A., Romano-Spica,V., and Dean,M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58, 5337-5339.
4. Ayrton,A., and Morgan,P. (2001). Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31, 469-497.
5. Bakos,E., Evers,R., Sinko,E., Varadi,A., Borst,P., and Sarkadi,B. (2000). Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol. Pharmacol.* 57, 760-768.
6. Belinsky,M.G., Bain,L.J., Balsara,B.B., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (1998). Characterization of MOAT-C and MOATD, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1735-1741.
7. Berge,K.E., Tian,H., Graf,G.A., Yu,L., Grishin,N.V., Schultz,J., Kwiterovich,P., Shan,B., Barnes,R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771-1775.
8. Berger,H.A., Anderson,M.P., Gregory,R.J., Thompson,S., Howard,P.W., Maurer,R.A., Mulligan,R., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1991). Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin. Invest* 88, 1422-1431.

9. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W.E., Hahmann, H.W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K.J., and Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22, 347-351.
- 5 10. Borst, P., and Elferink, R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537-592.
- 10 11. Bortfeld, M., Rius, M., Konig, J., Herold-Mende, C., Nies, A.T., and Keppler, D. (2006). Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience* 137, 1247-1257.
- 15 12. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouellette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J., Jr., and Hayden, M.R. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336-345.
- 20 13. Buchler, M., Konig, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., and Keppler, D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271, 15091-15098.
- 25 14. Byrne, J.A., Strautnieks, S.S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C.F., Linton, K.J., and Thompson, R.J. (2002). The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123, 1649-1658.
- 30 15. Chen, Z.S., Guo, Y., Belinsky, M.G., Kotova, E., and Kruh, G.D. (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol. Pharmacol.* 67, 545-557.
- 35 16. Chen, Z.S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Shchavezleva, I., Kotova, E., and Kruh, G.D. (2003a). Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol. Pharmacol.* 63, 351-358.
- 40 17. Chen, Z.S., Lee, K., and Kruh, G.D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol. Chem.* 276, 33747-33754.
- 45 18. Chen, Z.S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R.B., Kuwano, M., Zeng, H., and Kruh, G.D. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 62, 3144-3150.
- 50 19. Chen, Z.S., Robey, R.W., Belinsky, M.G., Shchavezleva, I., Ren, X.Q., Sugimoto, Y., Ross, D.D., Bates, S.E., and Kruh, G.D. (2003b). Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* 63, 4048-4054.
- 55 20. Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., and Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.
- 60 21. Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I., and Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* 55, 929-937.
22. Cui, Y., Konig, J., and Keppler, D. (2001). Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol. Pharmacol.* 60, 934-943.
23. Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58.
24. Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M., and Housman, D.E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 323, 728-731.

25. Hagmann,W., Nies,A.T., Konig,J., Frey,M., Zentgraf,H., and Keppler,D. (1999). Purification of the human apical conjugate export pump MRP2 reconstitution and functional characterization as substrate-stimulated ATPase. *Eur. J. Biochem.* 265, 281-289.
- 5 26. Higgins,C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
27. Holland,K.A., and Holland,I.B. (2005). Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52, 309-322.
- 10 28. Hooijberg,J.H., Broxterman,H.J., Kool,M., Assaraf,Y.G., Peters,G.J., Noordhuis,P., Scheper,R.J., Borst,P., Pinedo, H.M., and Jansen,G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 59, 2532-2535.
- 15 29. Hooijberg,J.H., Peters,G.J., Assaraf,Y.G., Kathmann,I., Priest,D.G., Bunni,M.A., Veerman,A.J., Scheffer,G.L., Kaspers,G.J., and Jansen,G. (2003). The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* 65, 765-771.
30. Hopper,E., Belinsky,M.G., Zeng,H., Tosolini,A., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 162, 181-191.
- 20 31. Ilias,A.; Urban,Z., Seidl,T.L., Le Saux,O., Sinko,E., Boyd,C.D., Sarkadi,B., and Varadi,A. (2002). Loss of ATPdependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J. Biol. Chem.* 277, 16860-16867.
- 25 32. Imai,Y., Asada,S., Tsukahara,S., Ishikawa,E., Tsuruo,T., and Sugimoto,Y. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol. Pharmacol.* 64, 610-618.
- 30 33. Inagaki, N., Gonoï,T., Clement,J.P., Wang,C.Z., Aguilar-Bryan,L., Bryan,J., and Seino,S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 16, 1011-1017.
- 35 34. Jedlitschky,G., Leier,I., Buchholz,U., Barnouin,K., Kurz,G., and Keppler,D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56, 988-994.
- 40 35. Jedlitschky,G., Tirschmann,K., Lubenow,L.E., Nieuwenhuis,H.K., Akkerman,J.W., Greinacher,A., and Kroemer, H.K. (2004). The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood* 104, 3603-3610.
- 45 36. Kartenbeck,J., Leuschner,U., Mayer,R., and Keppler,D. (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23, 1061-1066.
- 50 37. Keppler,D., Jedlitschky,G., and Leier,I. (1998). Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol.* 292, 607-616.
38. Kiuchi,Y., Suzuki,H., Hirohashi,T., Tyson,C.A., and Sugiyama,Y. (1998). cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* 433, 149-152.
39. Klugbauer,N., and Hofmann,F. (1996). Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 391, 61-65.
40. Kool,M., van der,L.M., de Haas,M., Baas,F., and Borst,P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 59, 175-182.
- 55 41. Lee,K., Belinsky,M.G., Bell,D.W., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (1998). Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.* 58, 2741-2747.
- 60 42. Leier,I., Jedlitschky,G., Buchholz,U., Cole,S.P., Deeley,R.G., and Keppler,D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 269, 27807-27810.
43. Luciani,M.F., Denizot,F., Savary,S., Mattei,M.G., and Chimini,G. (1994). Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21, 150-159.

44. Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J., and Stieger, B. (2000). Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 57, 634-641.
- 5 45. Matsumura, Y., Umekawa, T., Kawamura, H., Takaoka, M., Robinson, P.S., Cook, N.D., and Morimoto, S. (1992). A simple method for measurement of phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme activity. *Life Sci.* 51, 1603-1611.
- 10 46. Mayer, R., Kartenbeck, J., Buchler, M., Jedlitschky, G., Leier, I., and Keppler, D. (1995). Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transportdeficient mutant hepatocytes. *J. Cell Biol.* 131, 137-150.
47. Meier, P.J., and Boyer, J.L. (1990). Preparation of basolateral (sinusoidal) and canalicular plasma membrane vesicles for the study of hepatic transport processes. *Methods Enzymol.* 192, 534-545.
- 15 48. Noe, J., Stieger, B., and Meier, P.J. (2002). Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123, 1659-1666.
- 20 49. Pavsek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J.W., and Schinkel, A.H. (2005). Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 144-152.
- 25 50. Pratt, S., Shepard, R.L., Kandasamy, R.A., Johnston, P.A., Perry, W., III, and Dantzig, A.H. (2005). The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.* 4, 855-863.
51. Raggars, R.J., van, H.A., Evers, R., and van, M.G. (1999). The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 3), 415-422.
- 30 52. Raggars, R.J., Vogels, I., and van, M.G. (2001). Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes plateletactivating factor. *Biochem. J.* 357, 859-865.
- 35 53. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van, d.H., I, Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9244-9249.
54. Ringpfeil, F., Leibold, M.G., Christiano, A.M., and Uitto, J. (2000). Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6001-6006.
- 40 55. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., and. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- 45 56. Rius, M., Nies, A.T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G., and Keppler, D. (2003). Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38, 374-384.
- 50 57. Rius, M., Thon, W.F., Keppler, D., and Nies, A.T. (2005). Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. *J. Urol.* 174, 2409-2414.
58. Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A., and Scarborough, G.A. (1992). Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 4854-4858.
- 55 59. Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* 20, 233-238.
- 60 60. Sun, H., Molday, R.S., and Nathans, J. (1999). Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J. Biol. Chem.* 274, 8269-8281.
61. Takeuchi, T., Yoshitomi, S., Higuchi, T., Ikemoto, K., Niwa, S., Ebihara, T., Katoh, M., Yokoi, T., and Asahi, S. (2006).

- Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharm. Res.* 23, 1460-1472.
- 5 62. Tammur,J., Prades,C., Amould,I., Rzhetsky,A., Hutchinson,A., Adachi,M., Schuetz,J.D., Swoboda,K.J., Ptacek, L.J., Rosier,M., Dean,M., and Allikmets,R. (2001). Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 273, 89-96.
- 10 63. Tanigawara,Y., Okamura,N., Hirai,M., Yasuhara,M., Ueda,K., Kioka,N., Komano,T., and Hori,R. (1992). Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 840-845.
64. Trowsdale,J., Hanson,I., Mockridge,I., Beck,S., Townsend,A., and Kelly,A. (1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348, 741-744.
- 15 65. van Aobel,R.A., Srrieets,P.H., Peters,J.G., Bindels,R.J., and Russel,F.G. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am. Soc. Nephrol.* 13, 595-603.
- 20 66. Van der Blik,A.M., Baas,F., Ten Houte,d.L., Kooiman,P.M., Van,d., V, and Borst,P. (1987). The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J.* 6, 3325-3331.
- 25 68. Wang,J., Sun,F., Zhang,D.W., Ma,Y., Xu,F., Belani,J.D., Cohen,J.C., Hobbs,H.H., and Xie,X.S. (2006). Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: In vitro assay and reconstitution. *J. Biol. Chem.*
69. Wielinga,P., Hooijberg,J.H., Gunnarsdottir,S., Kathmann,I., Reid,G., Zelcer,N., van der,B.K., de,H.M., van,d.H., 1, Kaspers,G., Wijnholds,J., Jansen,G., Peters,G., and Borst,P. (2005). The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* 65, 4425-4430.
- 30 70. Williams J B et al (2003). Development of scintillation proximity assay for analysis of NA<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependent neurotransmitter transporter activity. *Analytical Biochem.*, Academic Press, San Diego,CA, USA, Vol 321, No. 1 Oct 2003, 37-37.
- 35 71. Young,S.G., and Fielding,C.J. (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 22, 316-318.
72. Zelcer,N., Reid,G., Wielinga,P., Kuil,A., van,d.H., I, Schuetz,J.D., and Borst,P. (2003). Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J* 371, 361-367.
- 40 73. Zeng,H., Liu,G., Rea,P.A., and Kruh,G.D. (2000). Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res.* 60, 4779-4784

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GmbH & CO KG  
 <120> Método para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte  
 5  
 <130> p01-2128  
 <160> 2  
 <170> Patentin versión 3.3  
 10  
 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> humana  
 15  
 <400> 1  
                                   **Ser Asn Gly Gln Pro Ser Thr Leu Thr ILe Phe Glu Thr Ala Leu**  
                                   **1                                  5                                  10                                  15**  
 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> humana  
 20  
 <400> 2  
           **Gly His Thr Asp His Met Val Thr Asn Thr Ser Asn Gly Gln Pro Ser Thr Leu Thr ILe**  
           **1                                  5                                  10                                  15                                  20**  
             
           **Phe Glu Thr Ala Leu**  
           **21                                  25**  
 25

## REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la actividad de transporte de una proteína de transporte ABC, caracterizado porque el método comprende:

- mezclar:

(i) una vesícula dentro-fuera ("inside-out") que porta por lo menos una proteína de transporte ABC de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula con:

(ii) una perla de ensayo de centelleo por proximidad (SPA) adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte con:

(iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte (es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos) con:

(iv) un sustrato marcado radioactivamente que puede ser transportado por la proteína de transporte bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato, en presencia de ATP, e

- incubar la mezcla durante por lo menos 30 segundos para permitir la unión directa o indirecta de las vesículas a la perla de SPA y para permitir el transporte de sustrato al interior de la vesícula, y

- medir la luz emitida por el líquido de centelleo de la perla.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína de transporte se selecciona de entre un grupo que consiste de MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), MRP5 (ABCC5), MRP6 (ABCC6), MRP7 (ABCC10), MRP8 (ABCC11), SUR1 (ABCC8), SUR2 (ABCC9), CFTR (ABCC7), ABCA1, ABCA3, ABCA4, ABCG5, ABCG8, MDR1 (ABCB1), MDR3 (ABCB4), BSEP (ABCB11), BCRP (ABCG2), TAP1 (ABCB2) y TAP2 (ABCB3).

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sustrato se selecciona de entre un grupo que consiste de ADP, BQ-123, colesterol, cimetidina, colchicina, AMP cíclico, GMP cíclico, sulfato de deshidroepiandrosterona, daunomicina, digoxina, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, etopósido, ácido fólico, glucosilceramida, glucoquenodesoxicolato, glicocolato, leucotrieno C4, leucotrieno D4, leucotrieno E4, metotrexato, mitoxantona, sulfobromoftaleína, paclitaxel, factor activador de plaquetas, prostaglandina E1, prostaglandina E2, prostaglandina F2-alfa, ritonavir, saquinavir, tromboxano B2, verapamil, sitosterol, tauroquenodesoxicolato, taurocolato, tauroursodesoxicolato, prazosina, vincristina y vinblastina.

4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que como proteína de transporte y como sustrato se utiliza una de las combinaciones siguientes:

proteína de transporte/acróónimo del gen: sustrato

MRP1 / ABCC1 :	leucotrieno C4, leucotrieno D4, leucotrieno E4, glucurónido de estradiol, ácido fólico o metotrexato;
MRP2 / ABCC2 :	leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, ácido fólico, metotrexato o sulfobromoftaleína;
MRP3 / ABCC3 :	leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, ácido fólico, metotrexato o glicocolato;
MRP4 / ABCC4 :	leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, sulfato de deshidroepiandrosterona, ácido fólico, GMPc, AMPc, ADP, metotrexato, prostaglandina E1, prostaglandina E2, prostaglandina F2-alfa o tromboxano B2;
MRP5 / ABCC5 :	ácido fólico, GMPc, AMPc, metotrexato, 5-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato, 5-fluorouridina 5'-monofosfato ó 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato;
MRP6 / ABCC6 :	leucotrieno C4 ó BQ-123;
CFTR / ABCC7 :	cloruro;
MRP7 / ABCC10 :	leucotrieno C4 ó glucurónido de estradiol;
MRP8 / ABCC11 :	AMPc, GMPc, leucotrieno C4, glucurónido de estradiol, estrona-3-sulfato, sulfato de deshidroepiandrosterona, taurocolato o glicocolato;
MDR1 / ABCB1 :	glucosilceramida, factor activador de plaquetas, daunomicina, digoxina, colchicina, etopósido, paclitaxel, verapamil, vincristina, vinblastina, ritonavir o saquinavir;

BSEP / ABCB11 :	taurocolato, glicocolato, tauroquenodesoxicolato, glicoquenodesoxicolato o tauroursodesoxicolato;
ABCA4 :	retinal;
BCRP / ABCG2 :	estróna-3-sulfato, glucurónido de estradiol, ácido fólico, metotrexato, mitoxantona, topotecán o cimetidina;
ABCG5 :	colesterol o sitosterol;
ABCG8 :	colesterol o sitosterol.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el periodo de incubación es de por lo menos 30 segundos y no es superior a 30 horas.

6. Método para medir la actividad de transporte de una proteína de transporte en un formato de alto rendimiento (HTS), **caracterizado porque** se lleva a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se utilizó MRP4 como proteína de transporte.

8. Método según la reivindicación 7, en el que, en (iii) del método según la reivindicación 1, se utiliza un anticuerpo que puede unirse a un péptido la secuencia del cual se proporciona en SEC ID nº 1 ó nº 2.

9. Método según la reivindicación 7 ó 8, en el que, en (ii) del método según la reivindicación 1, se utiliza una perla de SPA que ha sido recubierta con proteína A.

10. Método según la reivindicación 7 ó 8, en el que, en (ii) del método según la reivindicación 1, se utiliza una perla de SPA que ha sido recubierta con un anticuerpo adicional que puede unirse al anticuerpo según la reivindicación 8.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se utiliza MRP4 como proteína de transporte a la que se ha fusionado C-terminalmente una etiqueta de histidina.

12. Método según la reivindicación 11, en el que se utiliza MRP4 como proteína de transporte a la que se ha unido una etiqueta histidina de por lo menos 6 residuos de histidina.

13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que, en (ii) del método según la reivindicación 1, se utiliza una perla de SPA que ha sido recubierta con quelato de cobre.

14. Método para determinar si un compuesto es un modulador de la actividad de transporte de una proteína de transporte ABC, **caracterizado porque** el método comprende:

- mezclar:

(A)

(i) una vesícula dentro-fuera ("inside-out") que porta por lo menos una proteína de transporte ABC de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula, con:

(ii) una perla de ensayo de centelleo por proximidad (SPA) adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte, con:

(iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte, es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos, con:

(iv) un sustrato marcado radioactivamente que puede ser transportado por la proteína de transporte bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato, en presencia de ATP, con:

(v) un compuesto que debe someterse a ensayo, y mezclar:

(B)

(i) una vesícula que porta por lo menos una proteína de transporte de un modo en el que el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte se encuentra en el exterior de la vesícula con:

(ii) una perla de SPA adecuada para la unión directa o indirecta al extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte con:

(iii) (únicamente en el caso de la unión indirecta de una perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte) por lo menos una molécula que pueda mediar en la unión de la perla de SPA con el extremo C-terminal mismo de la proteína de transporte, es decir, de entre 1 y, como máximo, 25 aminoácidos, con:

## ES 2 372 317 T3

(iv) un sustrato marcado radioactivamente que puede ser transportado por la proteína de transporte bajo condiciones que permiten el transporte del sustrato (es decir, en presencia de ATP), y

- 5 - incubar las mezclas (A) y (B) durante un periodo de tiempo suficiente, por lo menos 30 segundos, para permitir la unión directa o indirecta de las vesículas con la perla de SPA y para permitir el transporte de sustrato al interior de la vesícula, y
- medir la luz emitida por el líquido de centelleo de la perla, en donde el valor incrementado obtenido con (A), en comparación con (B), identifica un compuesto que es un activador de la proteína de transporte sometida a ensayo, y
- 10 un valor reducido obtenido con (A), en comparación con (B), identifica un compuesto que es un inhibidor de la proteína de transporte sometida a ensayo.