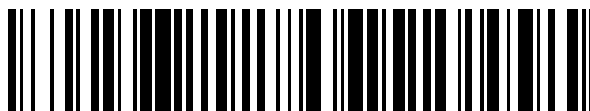


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 960**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2002 E 02738151 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1392822**

54 Título: **Línea de células de doble transfección útil para la identificación de inhibidores del transporte**

30 Prioridad:

06.06.2001 EP 01113805

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2013

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
(50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg , DE y
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CUI, YUNHAI;
KÖNIG, JÖRG y
KEPPLER, DIETRICH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 411 960 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

Línea de células de doble transfección útil para la identificación de inhibidores del transporte

La presente invención se refiere a una línea de células de doble transfección que contiene (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos, preferiblemente OATP8, enlazada operativamente con un promotor y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos, preferiblemente la proteína 2 de resistencia a multifármacos (MRP2), enlazada operativamente con un promotor. La presente invención se refiere también a diversos usos de dicha línea de células, preferiblemente para la identificación de inhibidores del transporte, v.g. fármacos candidato.

El transporte vectorial es una función importante de todas las células polarizadas que contribuyen a la detoxificación y a la prevención de la entrada de toxinas en los órganos. Esto se ilustra por los epitelios de los tubos renales proximales, por las células de la barrera hematoencefálica, por los epitelios intestinales, y, finalmente pero no por ello menos importante, por los hepatocitos. Una de las funciones hepatocelulares principales es la eliminación de sustancias endógenas y exógenas de la circulación sanguínea y su secreción en la bilis. Dos procesos de transporte juegan un papel decisivo en este transporte vectorial por los hepatocitos: la absorción sinusoidal (basolateral) de la sangre y la secreción canalicular (apical) en la bilis. En los hepatocitos humanos, la absorción independiente del sodio de aniones orgánicos anfifílicos está mediada por al menos tres proteínas de transporte, a saber por los transportadores de aniones orgánicos humanos OATP2 (conocido también como OATP-C o LST1, símbolo SLC21A6) (Abe *et al.* 1999; Hsiang *et al.*, 1999; König *et al.* 2000a; Cui *et al.* 2001), OATP8 humano (SLC21A8) (König *et al.* 2000b; Cui *et al.* 2001), y OATP-B humano (SLC21A9) (Kullak-Ublick *et al.* 2001). Los tres transportadores pertenecen al subgrupo 21A de la superfamilia de portadores de solutos (SLC). En tanto que OATP-B se expresa también en cierto número de otros tejidos, OATP2 y OATP8 se expresan exclusivamente en los hepatocitos humanos. El espectro de sustratos de OATPs incluye sales biliares, conjugados de hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, y muchos otros aniones orgánicos anfifílicos (Abe *et al.* 1999; König *et al.* 2000a, b; Cui *et al.* 2001; Kullak-Ublick *et al.* 2000, 2001). Al contrario de estos transportadores de absorción basolateral que se cree son de tipo intercambiador (Li *et al.* 1998), los transportadores de exportación apicales identificados en los hepatocitos humanos hasta ahora son miembros de la superfamilia de casetes de fijación de ATP (ABC) (Keppler y Arias 1997; Jansen 2000). La exportación de aniones orgánicos está mediada predominantemente por la bomba de exportación de sales biliares BSEP (ABCB11) perteneciente al subgrupo MDR (ABCB) de la superfamilia ABC (Strautnieks *et al.* 1998; Gerloff *et al.* 1998; Wang *et al.* 2001) y por la proteína 2 de resistencia a multifármacos (MRP2, ABCC2) perteneciente al subgrupo MRP (ABCC) de la superfamilia ABC (Büchler *et al.* 1996; Suzuki y Sugiyama 1998; König *et al.* 1999; Borst *et al.* 2000). Mientras que los sustratos principales de BSEP son sales biliares como colil-aurina y colato (Gerloff *et al.* 1998), los aniones orgánicos transportados por MRP2 son principalmente conjugados de sustancias lipófilas con glutatión, glucuronato, o sulfato (Evers *et al.* 1998; Cui *et al.* 1999, König *et al.* 1999).

El transporte transhepático de aniones orgánicos anfifílicos ha sido estudiado frecuentemente por el uso de compuestos modelo como sulfobromoftaleína (BSP) y verde de indocianina (ICG) (Scharschmidt *et al.* 1975). La caracterización funcional de los tres OATPs humanos identificados en la membrana basolateral de los hepatocitos demostró que los tres son capaces de mediar la absorción de BSP, con la afinidad máxima para OATP2 ($K_m = 140$ nM) y afinidad mínima ($K_m = 3,4$ μ M) para OATP8 (König *et al.* 2000b; Kullak-Ublick *et al.* 2001; Cui *et al.* 2001). En los hepatocitos, BSP se conjuga predominantemente con glutatión para producir el conjugado BSP--glutatión S (BSP-SG) (Whelan *et al.* 1970; Snel *et al.* 1995). Estudios con ratas mutantes deficientes en transporte (Jansen *et al.* 1987) que carecen de la bomba de exportación canalicular Mrp2 (Paulusma *et al.* 1996; Büchler *et al.* 1996; Ito *et al.* 1997) sugerían que esta bomba de exportación media la secreción de BSP-SG en la bilis. Sin embargo, no se estableció que BSP propiamente dicha sea un sustrato para MRP2 humana. Hasta ahora, las proteínas de transporte como OATPs y MRPs se estudiaron en la mayoría de los casos por el uso de células transfectadas de mamífero o por el uso de sistemas de oocitos de *Xenopus* que expresaban únicamente una proteína de transporte exógena recombinante (Madon *et al.* 1997; Ito *et al.* 1998; Evers *et al.* 1998; Cui *et al.* 1999, 2001; Abe *et al.* 1999; Hsiang *et al.* 1999; König *et al.* 2000a, b; Kullak-Ublick *et al.* 2001).

Cuando se desarrollan o se diseñan nuevos productos farmacéuticos, una de las cuestiones críticas es conocer si los compuestos candidato tienen efectos secundarios indeseables como la interferencia con el transporte de sustancias que son producidas o existen naturalmente en el cuerpo, v.g. la interferencia con el transporte hepático o renal de aniones orgánicos, como se ilustra por la interferencia de rifampicina, rifamicina SV, o CDNB con el transporte transcelular de BSP. Para ahorro de costes, es deseable detectar tales efectos secundarios de los fármacos candidato en una etapa de desarrollo temprana. Hasta ahora, para el estudio de los efectos secundarios potenciales de los fármacos candidato se utilizaban animales o cultivos de células. Sin embargo, estos métodos presentan una diversidad de desventajas, v.g. consumen mucho tiempo y costes, no permiten el cribado de alta capacidad de fármacos candidato, etc.

Por esta razón, es el objeto de la presente invención proporcionar un medio para el análisis eficiente de la interferencia de un fármaco candidato con el transporte de sustancias que son producidas o existen naturalmente en el cuerpo, en particular la interferencia con el transporte hepático o renal de aniones orgánicos que resuelva las desventajas de los sistemas utilizados actualmente.

De acuerdo con la invención, esto se consigue por las materias objeto definidas en las reivindicaciones. Se estableció un sistema de células con transportadores de la absorción y exportación humana definidos, es decir una línea de células MDCK de doble transfección que exprese permanentemente un transportador recombinante de la absorción para aniones orgánicos en la membrana basolateral y una bomba de exportación dependiente de ATP para conjugados aniónicos en la membrana apical. La absorción basolateral se mediaba por el transportador de aniones orgánicos humano OATP8 (símbolo SLC21A8) y la exportación apical subsiguiente por la proteína 2 de resistencia a multifármacos (MRP2; símbolo ABC2). En condiciones fisiológicas, ambas proteínas de transporte se expresan fuertemente en los hepatocitos y contribuyen a la eliminación hepatobiliar de aniones orgánicos. La expresión y localización de OATP8 y MRP2 en células MDCK que crecen en insertos de membranas Transwell se demostró por inmunotransferencia y microscopía confocal de barrido láser. La sulfobromoftaleína (BSP) marcada con ^3H era un sustrato para ambas proteínas de transporte y era transferida desde el compartimiento basolateral al apical a una tasa al menos 6 veces más rápida por las células MDCK-MRP2/OATP8 de doble transfección que por las células MDCK-OATP8 o MDCK-MRP2 de transfección simple. El transporte vectorial a una tasa mucho mayor por las células de doble transfección que por las de transfección simple se observó también para los sustratos marcados con ^3H leucotrieno C_4 , 17 β -glucuronosil-estradiol, y sulfato de deshidroepiandrosterona, para el sustrato aniónico fluorescente fluo-3, y para el antibiótico rifampicina. Estudios de inhibición indicaron que la formación intracelular de S-(2,4-dinitrofenil)-glutatión a partir de 2,4-clorodinitrobenzoceno inhibe selectivamente el transporte transcelular de [^3H]BSP en el sitio de exportación mediada por MRP2.

La identificación de los nuevos sustratos para MRP2 y OATP8 demuestra que la línea de células de doble transfección es útil para la caracterización de estos transportadores. En comparación con las células MDCK transfectadas por separado con OATP8 o MRP2, los transfectantes dobles presentan varias ventajas. Hasta ahora había sido difícil estudiar la función de MRP2 en células enteras debido a que la mayoría de los sustratos para MRP2 están cargados negativamente en condiciones fisiológicas y por tanto no pueden atravesar la membrana plasmática sin un transportador de absorción. Por esta razón, MRP2 se ha estudiado en la mayoría de los casos utilizando vesículas de membrana dentro-fuera preparadas a partir de células que expresan MRP2. Con las células MDCK de doble transfección que expresan OATP8 y MRP2 y con compuestos como [^3H]BSP y Fluo-3, que son sustratos para ambos transportadores, es posible ahora cribar más fácilmente en busca de inhibidores de MRP2 con células intactas. Un inhibidor para sólo MRP2 inhibirá el transporte transcelular y mejorará la acumulación intracelular de [^3H]BSP. Un inhibidor para ambos MRP2 y OATP8 reducirá el transporte transcelular más fuertemente que la acumulación intracelular de [^3H]BSP. Debido a la manipulación más fácil de las células de doble transfección cultivadas en insertos de membranas Transwell en comparación con la preparación y manipulación de vesículas de membrana, es posible desarrollar sistemas de cribado de alta capacidad para inhibidores de MRP2 por el uso de las células de doble transfección. El uso del penta-anión fluorescente Fluo-3 como sustrato para ambos OATP8 y MRP2 puede facilitar adicionalmente el cribado.

En conclusión, las células de doble transfección de la presente invención proporcionan un sistema útil para la identificación de sustratos de transporte e inhibidores del transporte con inclusión de fármacos candidato. Por utilización de la línea de células de doble transfección de la presente invención, puede investigarse el efecto inhibitorio de los fármacos candidato sobre proteínas de transporte definidas que están, v.g., presentes en el hígado, el riñón, el intestino o la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una línea de células de doble transfección, que es una línea de células estable que contiene (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos enlazada operativamente con un promotor, y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos enlazada operativamente por un promotor. El transportador de absorción para aniones orgánicos se expresa en la membrana basolateral de las células y la bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos se expresa en la membrana apical de las células.

Preferiblemente, para transfección de las células, las secuencias de DNA se presentan en un vector o vector de expresión. Una persona experta en la técnica está familiarizada con ejemplos de los mismos. Las secuencias de DNA pueden estar contenidas también en un virus recombinante que contenga casetes de expresión apropiadas. Virus adecuados que pueden utilizarse en la presente invención incluyen baculovirus, vaccinia, virus sindbis, SV40, virus Sendai, adenovirus, un virus AAV o un parvovirus, tal como MVM o H-1. El vector puede ser también un retrovirus, tal como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV. Para expresión en mamíferos, un promotor adecuado preferido es el citomegalovirus humano "promotor temprano inmediato" (pCMV).

Para generar las secuencias de DNA arriba descritas y para la construcción de vectores de expresión que contengan dichas secuencias de DNA, es posible utilizar métodos generales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen v.g. técnica de recombinación in vitro, métodos de síntesis y métodos de recombinación in vivo como se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, por ejemplo. Métodos de transfección de las células, de selección fenotípica de transfectantes y de expresión del DNA de acuerdo con la invención por utilización de los vectores arriba descritos se conocen en la técnica.

Preferiblemente, la línea de células es una línea de células humana. Las células son células polarizadas, v.g. hepatocitos, células de riñón, v.g. MDCKII o HepG2.

En una realización adicional preferida de la línea de células de doble transfección de la presente invención, el transportador de absorción para aniones orgánicos es un miembro del subgrupo 21A de la superfamilia portadora de solutos (SLC). Se prefieren particularmente OAT1 (SLC22A6) (Hosoyamada *et al.* 1999), OATP2, OATP8 or OATP-B.

En una realización más preferida de la línea de células de doble transfección de la presente invención, la bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos es un miembro del subgrupo MDR (ABCB) o el subgrupo MRP (ABCC) de la superfamilia ABC. Se prefieren particularmente la bomba de exportación de sales biliares BSEP (ABCB11) o la proteína 2 de resistencia a multifármacos (MRP2). Una combinación de OAT1 con MRP2 las dos cuales se expresan en las células de los túbulos renales humanos proximales (Tojo *et al.* 1999; Schaub *et al.* 1999), puede servir para estudiar el aclaramiento renal de aniones orgánicos.

En una realización aún más preferida de la línea de células de doble transfección de la presente invención, la secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos y/o la secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos están enlazadas operativamente con un promotor que permite expresión fuerte.

En ciertos casos para investigación del efecto del metabolismo intracelular de fármacos sobre el transporte, podría ser deseable transfectar las células de la invención con una secuencia de DNA que codifique un tercer compuesto cuya naturaleza puede variar de acuerdo con el fármaco a estudiar.

Por último, la presente invención se refiere a diversos usos de la línea de células de doble transfección. Un uso preferido es la identificación de un sustrato de transporte o un inhibidor del transporte, particularmente un fármaco candidato. Formatos de ensayos adecuados son conocidos por las personas expertas y, v.g., se describen más adelante en los ejemplos. Un formato de ensayo preferido es el cribado de alta capacidad.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Análisis por inmunotransferencia de MRP2 y OATP8 en células MDCK transfectadas. Fracciones crudas de membrana de células MDCK transfectadas permanentemente con vector de control (MDCK-Co), con MRP2 humana (MDCK-MRP2), con OATP8 humano (MDCK-OATP8), o con cDNA de ambos MRP2 y OATP8 (MDCK-MRP2/OATP8) se separaron por SDS-PAGE. A, La MRP2 humana se detectó con el anticuerpo policlonal EAG5 (Keppler y Kartenbeck 1996; Schaub *et al.* 1999). B, La OATP8 humano se detectó con el anticuerpo policlonal SKT (König *et al.* 2000b). En el caso de OATP8, se indica sólo la forma totalmente glicosilada por una punta de flecha, en tanto que la banda a aproximadamente 90 kDa representa una forma infraglicosilada de la proteína (König *et al.* 2000b).

Fig. 2 Inmunolocalización de MRP2 y OATP8 recombinantes en células MDCK. Células MDCK que expresaban OATP8 solo (A, D) o MRP2 y OATP8 (B, C, E, y F) se cultivaron en insertos de membranas Transwell y se examinaron por microscopía confocal de barrido láser. OATP8 (fluorescencia verde) y MRP8 (fluorescencia roja) se tiñeron utilizando el anticuerpo policlonal SKT (König *et al.* 2000b) y el anticuerpo monoclonal M₂III6 (Evers *et al.* 1998), respectivamente. A y B son imágenes "en face" enfocadas en la parte media de la monocapa de células, C es una imagen "en face" enfocada en la parte superior de la monocapa de células. D, E y F son secciones verticales en las posiciones indicadas por las líneas blancas en A, B, y C. Además de la localización lateral de OATP8, puede verse cierta tinción intracelular de esta proteína en las secciones verticales. Únicamente MRP2 se localiza en la membrana apical (E, F). Barra, 10/μM.

Fig. 3. Esquema de los transfectantes MDCK que se desarrollan en los insertos de las membranas Transwell como una monocapa polarizada. La membrana apical orientada al medio de cultivo está separada de la membrana basolateral orientada al soporte de la membrana por las juntas fuertes. La bomba de exportación MRP2 está localizada en la membrana apical, en tanto que el transportador de absorción OATP8 está localizado en la membrana basolateral.

Fig. 4. Transporte transcelular de [³H]BSP. Se cultivaron células MDCK-Co (e), MDCK-MRP2 (s), MDCK-OATP8 (c), and MDCK-MRP2/OATP8 (g) en insertos de membranas Transwell. Se añadió [³H]BSP (1 μM) a los compartimientos basolaterales. En los momentos puntuales que se indican, se determinó la radiactividad en los compartimientos apicales (*Transcellular [³H]BSP transport*) y en el interior de las células (*Intracellular [³H]BSP accumulation*). Se calculó la absorción total de [³H]BSP como la suma de la radiactividad intracelular y apical. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4). Para la mayoría de las medidas, la desviación estándar estaba dentro del tamaño de los símbolos.

Fig. 5. Transporte vectorial y eflujo de [³H]BSP. Se cultivaron células MDCK-OATP8 y MDCK-MRP2/OATP8 en insertos de membranas Transwell. A, Transporte vectorial de [³H]BSP. Se añadió [³H]BSP (1 μM) a los compartimientos basolaterales (B @ A) o a los compartimientos apicales (A @ B). Después de 15 minutos a 37°C, se midió la radiactividad en los compartimientos opuestos. B., Eflujo de [³H]BSP. Se incubaron

células MDCK-OATP8 y MDCK-MRP2/OATP8 con [³H]BSP (1 μM) en los compartimientos basolaterales a 37°C durante 30 min. Las células se lavaron luego con tampón frío y se incubaron con tampón sin [³H]BSP a 37°C durante 30 min. Se midió la radiactividad liberada subsiguientemente en el compartimiento basolateral y el apical y en el interior de las células. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4).

- 5 **Fig. 6.** Análisis HPLC de [³H]BSP. Las células MDCK-MRP2/OATP8 cultivadas en los insertos de membranas Transwell se incubaron con [³H]BSP 1 μM en el compartimiento basolateral a 37°C durante 30 min. Se indican el medio en el compartimiento apical y el lisado de células se analizaron por radio-HPLC como se describe en "Materiales y Métodos". A, [³H]BSP auténtico (Cui *et al.*, 2001); B, radiactividad recogida en el compartimiento apical; C, radiactividad acumulada en las células. [³H]BSP (punta de flecha) y el conjugado con glutatión S de [³H]BSP ([³H]BSP-SG, flecha). Se añadió Acivicina, un inhibidor de la degradación del resto glutatión de [³H]BSP-SG a la incubación, en una concentración de 5 mM.
- 10
- Fig. 7.** Transporte de [³H]BSP dependiente de ATP por MRP2 humana. A, vesículas de membrana dentro-fuera de células HEK293 transfectadas con MRP2 humana (HEK-MRP2) se incubaron con [³H]BSP 1 μM en presencia de ATP (g) o 5'-AMP (c). B, el transporte neto de [³H]BSP dependiente de ATP a las vesículas por las células HEK-MRP2 (g) o las células HEK-Co (c) se calculó por sustracción de los valores determinados en presencia de 5'-AMP de los correspondientes en presencia de ATP. C, el valor K_m de MRP2 humana para BSP se determinó a concentraciones de BSP comprendidas entre 1 y 10 μM. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4).
- 15
- Fig. 8.** Transporte transcelular de aniones orgánicos. Células MDCK-Co, MDCK-OATP8, y MDCK-MRP2/OATP8 cultivadas en insertos de membranas Transwell se incubaron con [³H]BSP (1 μM), [³H]LTC₄ (0.5 μM), [³H]E₂17bG (5 μM), [³H]DHEAS (5 μM), Fluo-3 (2 μM) o [³H] colil-aurina (5 μM) en los compartimientos basolaterales a 37°C. Se midió luego la radiactividad (sustratos marcados) o la fluorescencia (Fluo-3) en los compartimientos apicales al cabo de 30 min. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4).
- 20
- Fig. 9.** Inhibición del transporte transcelular de [³H]BSP. Células MDCK-OATP8 (A, C, E, G), y MDCK-MRP2/OATP8 (B, D, F, H) cultivadas en insertos de membranas Transwell se incubaron con [³H]BSP (1 μM) en los compartimientos basolaterales en presencia de concentraciones diferentes de seroalbúmina humana (HSA, C, D), rifampicina (E, F), o rifamicina SV (G, H). Para 2,4-cloro-dinitrobenzoceno (CDNB) (A, B), las células se preincubaron con CDNB a la temperatura ambiente durante 20 min, se inició el transporte de [³H]BSP por reemplazamiento del tampón en los compartimientos basolaterales por tampón reciente que contenía [³H]BSP y CDNB. Después de la incubación durante 30 min a 37°C, la radiactividad en los compartimientos apicales y en el interior de las células se midió. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4).
- 25
- Fig. 10.** Transporte transcelular de rifampicina. Células MDCK-Co, MDCK-MRP2, MDCK-OATP8, y MDCK-MRP2/OATP8 cultivadas en insertos de membranas Transwell se incubaron con rifampicina 50 μM en los compartimientos basolaterales a 37°C durante 30 min. La concentración de rifampicina en los compartimientos apicales se determinó por la absorción específica de rifampicina a 475 nm. Los datos representan valores medios ± SD (n = 4).
- 30
- Fig. 11.** Inmunolocalización de las proteínas recombinantes de transporte en líneas de células de doble transfección. Células MDCKII transfectadas con OAT1 y MRP2 (A, C) o con OATP2 y MRP2 (B, D) se cultivaron en insertos de membranas Transwell. La MRP2 recombinante se tiñó con el antisuero EAG5 (verde en A, C) o con el anticuerpo comercial M₂11i6 (rojo en B, D). El OAT1 recombinante se tiñó con un anticuerpo monoclonal comercial contra un epítope en el término carboxilo de OAT1 (rojo en A, C). La OATP2 recombinante se tiñó con el antisuero policlonal ESL (verde en B, D). En ambas líneas de células de doble transfección, se localizaba MRP2 en la membrana apical de las células MDCKII polarizadas. OAT1 y OATP2 se detectaban únicamente en la membrana basolateral de las líneas de células respectivas.
- 35
- Fig. 12:** Transporte transcelular de para-aminohipurato (PAH) por las células MDCK-OAT1/MRP2. Las células MDCKII transfectadas con vector de control (MDCK-Co), con OAT1 (MDCK-OAT1), o con ambas OAT1 y MRP2 (MDCK-OAT1/MRP2) se cultivaron en insertos de membranas Transwell y se incubaron con [³H]PAH 10 μM añadido al compartimiento basolateral a 37°C. La radiactividad acumulada en el compartimiento apical se midió al cabo de 30 minutos.
- 40
- Fig. 13:** Transporte transcelular de BSP por las células MDCK-OATP2/MRP2. Las células MDCKII transfectadas con vector de control (MDCK-Co), con OATP2 (MDCK-OATP2), o con ambas OATP2 y MRP2 (MDCK-OATP2/MRP2) se cultivaron en insertos de membranas Transwell y se incubaron con [³H]BSP 1 μM añadido al compartimiento basolateral a 37°C. La radiactividad acumulada en el compartimiento apical se midió al cabo de 30 min.
- 45
- 50
- 55

Abreviaturas: ABC; superfamilia de casetes de fijación de ATP; BSEP, bomba de exportación de sales biliares; BSP, sulfobromoftaleína; CDNB, 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno, DHEAS, deshidroepiandrosterona-3-sulfato; DiOC6(3), 3,3'-dihexiloxacarbocianina-yoduro; E₂17bG,

17b-glucuronosil-estradiol; Fluo-3, ácido 1-[2-amino-5-(2,7-dicloro-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)]-2-(2'-amino-5'-metil-fenoxil)-etano-N,N,N',N'-tetraacético, sal pentaamónica; HEK293, células de riñón de embrión humano; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; HSA, seroalbúmina humana; K_m , constante de Michaelis-Menten; LTC₄, leucotrieno C₄; MDCKII, células de riñón canino Madin-Darby, cepa II; MRP2, proteína 2 de resistencia a multifármacos; OAT1, transportador 1 de aniones orgánicos; OATP, polipéptido de transporte de aniones orgánicos humano; OCT1, transportador 1 de cationes orgánicos; SLC, superfamilia de transportadores de solutos; TC, taurocolato o colil-taurina; SDS, dodecil-sulfato de sodio.

La presente invención se explica por los ejemplos.

10 Ejemplo 1: Materiales y Métodos

(a) **Productos químicos.** [³H]BSP (0,5 TBq/mmol) se obtuvo de Hartmann Analytic (Colonia, Alemania) por síntesis de encargo (Cui *et al.* 2001). [14,15,19,20-³H]LTC₄, [1,2,6,7-³H]deshidroepiandrosterona-sulfato (0,6 TBq/mmol), [³H]colil-taurina (73 GBq/mmol), y 17b-D-glucuronosil-[6,7-³H]estradiol (1,6 TBq/mmol) se adquirieron de Perkin-Elmer Life Science Products (Boston, MA). El ácido [¹⁴C]inulin-carboxílico (82 MBq/g) se obtuvo de Biotrend Chemicals (Colonia, Alemania). El Fluo-3 (ácido (1-[2-amino-5-(2,7-dicloro-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)]-2-(2'-amino-5'-metil-fenoxil)-etano-N,N,N',N'-tetraacético, sal pentaamónica) era de Calbiochem (Bad Soden, Alemania). Rifampicina, rifamicina SV, acivicina, y CDNB se adquirieron de Sigma (Deisenhofen, Alemania). G418 (geneticina)-sulfato era de Life Technologies (Gaithersburg, MD). La higromicina era de Invitrogen (Groningen, Holanda). Los productos químicos adicionales no radiactivos de pureza analítica se obtuvieron de Sigma.

(B) **Cultivo y Transfección de las Células.** Las células HEK293 (de riñón de embrión humano) y MDCKII (cepa II de riñón canino Madin-Darby) se cultivaron en medio esencial mínimo suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C, 95% de humedad, y 5% de CO₂. HEK-MRP2 y HEK-Co son células HEK293 transfectadas con cDNA de MRP2 humana y vector de control, respectivamente; MDCK-MRP2 y MDCK-Co son células MDCKII transfectadas con cDNA de MRP2 humana y vector de control, respectivamente, como se ha descrito (Cui *et al.* 1999).

El cDNA de OATP8 humano (König *et al.* 2000b) se subclonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA, 3.1/Hygro(+) (Invitrogen) y se transfectó en células MDCKII utilizando el método del polibreno (König *et al.* 2000b). Los transfectantes que expresaban OATP8 recombinante se seleccionaron con higromicina (950 µM). El clon que exhibía la expresión máxima de OATP8 (MDCK-OATP8) se transfectó ulteriormente con el constructo vector pcDNA3.1-MRP2 con el cDNA de MRP2 humano de longitud total (Cui *et al.* 1999). Después de selección con 950 µM de higromicina y 800 µM de G418-disulfato durante 3 semanas, los transfectantes se cribaron en cuanto a expresión tanto de MRP2 como de OATP8 por análisis de inmunotransferencia. Un clon con la expresión máxima de MRP2 y un nivel de expresión similar de OATP8 como células MDCK-OATP8 se designó MDCK-MRP2/ATP8 y se seleccionó para estudios ulteriores.

(C) **Análisis por Inmunotransferencia.** Se prepararon fracciones de membrana crudas de las células MDCKII cultivadas como se ha descrito anteriormente (Cui *et al.* 1999). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (geles al 7,5%). La OATP8 se detectó con el anticuerpo policlonal SKT (König *et al.* 2000b) a una dilución de 1:5000 en TBS-T (20 mM Tris, 145 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6). La MRP2 se detectó con el anticuerpo policlonal EAG5 (Büchler *et al.*, 1996; Keppler y Kartenbeck, 1996) a una dilución de 1:10.000 en TBS-T.

(D) **Microscopía de Inmunofluorescencia Confocal de Barrido Láser.** Las células MDCKII se cultivaron en insertos de membranas Transwell (6,5 mm de diámetro, 0,4 µm de tamaño de poro, Corning Costar, Bodenheim, Alemania) durante 3 días hasta confluencia y se indujeron con 10 mM butirato de sodio durante 24 h (Cui *et al.* 1999). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2,5% en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,0 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) durante 20 min, se permeabilizaron con 1% Triton X-100 en PBS durante 20 min, y se incubaron durante 1,5 horas con anticuerpos primarios a la temperatura ambiente. El anticuerpo policlonal SKT (König *et al.* 2000b), a una dilución de 1:25 en PBS, y el anticuerpo monoclonal de ratón M₂III-6 (Alexis Biochemicals, Grünberg, Alemania) a una dilución de 1:20 en PBS, se utilizaron para teñir OATP8 y MRP2, respectivamente. Las células se lavaron luego 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios. Tanto IgG anticonejo de cabra conjugado con Cy2 como IgG anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 se obtuvieron de Jackson Laboratories, West Grove, PA) y se utilizaron a una dilución de 1:200 en PBS. Las membranas Transwell se cortaron luego de los insertos de membrana y se montaron utilizando glicerol al 50% en PBS en los portaobjetos. La microscopía confocal de barrido láser se realizó con un aparato LSM 510 de Zeiss (Oberkochen, Alemania).

(E) **Ensayos de Transporte.** Para los ensayos de transporte, se cultivaron células MDCKII en insertos de membranas Transwell (diámetro 24 mm, tamaño de poro 0,4 µm, Corning Costar) hasta confluencia durante 3 días y se indujeron con 10 mM butirato de sodio durante 24 h. las células se lavaron primeramente con tampón de transporte (142 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂, 5 mM glucosa, y 12,5 mM HEPES, pH 7.3), subsiguientemente, se añadieron sustratos marcados con ³H en tampón de transporte a los compartimientos apicales (1 ml) o a los compartimientos basolaterales (1,5 ml). Después de los periodos de tiempo indicados, se midió la radiactividad en los compartimientos opuestos. La acumulación intracelular de la radiactividad

se determinó por lisis de las células con 2 ml de SDS al 0,2% en agua y medida de la radiactividad en los lisados de células.

Para estudiar el transporte transcelular de Fluo-3, se incubaron las células con 2 μM Fluo-3 en los compartimientos basolaterales a 37°C durante 30 min. La fluorescencia de Fluo-3 en el compartimiento apical se midió con un espectrómetro de fluorescencia RF-510 (Shimadzu, Duisburg, Alemania) a una longitud de onda de excitación de 506 nm (anchura de banda 5 nm) y una longitud de onda de emisión de 526 nm (anchura de banda 10 nm) en presencia de 1,5 mM Ca^{2+} (Nies *et al.* 1998).

Para estudiar el transporte transcelular de rifampicina, se incubaron las células con 5 μM rifampicina en los compartimientos basolaterales a 37°C durante 30 min. Para determinar la concentración de rifampicina en los compartimientos apicales, se midió su absorción a 475 nm con un espectrofotómetro (Ultrospec III, Amersham-Pharmacia, Freiburg Alemania). Se determinó una curva de calibración para el cálculo de las concentraciones de rifampicina en el intervalo de concentraciones entre 1 y 50 μM .

Para los estudios de inhibición, se añadieron los inhibidores simultáneamente con [^3H]BSP en los compartimientos basolaterales, con la excepción de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB). En este caso, las células MDCKII cultivadas en insertos de membranas Transwell se preincubaron con CDNB en tampón de transporte en ambos compartimientos apical y basolateral durante 20 min a la temperatura ambiente. El transporte transcelular se inició luego reemplazando el tampón en los compartimientos basolaterales por tampón reciente que contenía CDNB y [^3H]BSP.

La fuga transcelular se determinó por incubación de las células con 50 μM ácido [^{14}C]inulin-carboxílico en los compartimientos basolaterales durante 30 min y medida de la radiactividad en los compartimientos apicales. Para las 4 líneas de células MDCKII utilizadas en este trabajo, la fuga transcelular era menor que 1%.

Análisis HPLC de [^3H]BSP. Las células MDCK-MRP2/OATP8 cultivadas en insertos de membranas Transwell se incubaron con 1 μM [^3H]BSP en el compartimiento basolateral durante 30 min a 37°C después de una pre-incubación con 5 mM acivicina, un inhibidor de la g-glutamilttransferasa (Allen *et al.* 1980), en ambos compartimientos durante 30 min a 37°C. La radiactividad en el compartimiento apical y en el lisado de células se analizó por HPLC. Se realizaron análisis HPLC en fase inversa en una columna C_{18} Hypersil (partículas de 5 mm; Shandon, Runcorn, Reino Unido) como se ha descrito (Cui *et al.* 2001) utilizando una elución en gradiente lineal desde 100% tampón A (45% metanol/55% agua que contenía 2 mM hidróxido de tetrabutilamonio a pH 6,0) hasta 100% tampón B (90% metanol/10% agua que contenía 2 mM hidróxido de tetrabutilamonio a pH 6,0) a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se sintetizó [^3H]BSP-SG para los análisis HPLC por incubación de 1 mM GSH, 0,4 mM [^3H]BSP (1 μCi), y 5 mM acivicina con 350 μl de citosol de hígado de ratón en un volumen final de 500 μl durante 1 hora a 37°C. Después de desproteinización con 3 volúmenes de metanol 200 μl se analizó el sobrenadante por HPLC como se ha descrito arriba.

Estudios de transporte de vesículas. El transporte de [^3H]BSP a vesículas de membrana se midió por el método de filtración rápida (Keppler *et al.* 1998). Resumidamente, las vesículas de membrana (30 μg de proteína) se incubaron en presencia de 4 mM ATP, 10 mM creatina-fosfato, 100 $\mu\text{g/ml}$ creatina-quinasa y [^3H]BSP en un tampón de incubación (250 mM sacarosa, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) en un volumen final de 55 μl a 37°C. Se tomaron partes alícuotas (15 μl) en los momentos indicados, se diluyeron en 1 ml de tampón de incubación enfriado en hielo, y se filtraron inmediatamente a través de membrana de nitrocelulosa preimpregnada (tamaño de poro 0,2 μm , Schleicher & Schüll, Dassel, Alemania). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón de incubación, se disolvieron en fluido de centelleo líquido, y se contaron respecto a radiactividad. En experimentos de control, el ATP se reemplazó por una concentración igual de 5'-AMP. El transporte dependiente de ATP se calculó por sustracción de los valores obtenidos en presencia de 5'-AMP de los obtenidos en presencia de ATP.

Ejemplo 2: Expresión y Localización de OATP8 y MRP2 Humanos Recombinantes en Células MDCKII

La expresión de OATP8 y MRP2 humanos en las células MDCKII transfectadas se analizó primeramente por inmunotransferencia (Fig. 1). Como se muestra en Fig. 1A, la expresión de MRP2 se detectó con el anticuerpo EAG5 en las células MDCKII transfectadas con cDNA de MRP2 solo (MDCK-MRP2) o con cDNA de ambos OATP8 y MRP2 (MDCK-MRP2/OATP8). La expresión de OATP8 se detectó con el anticuerpo SKT en células MDCKII transfectadas con cDNA de OATP8 solo (MDCK-OATP8) y en células MDCK-MRP2/OATP8 (Fig. 1B). Consistentemente con el informe anterior de los autores de la presente invención (König *et al.* 2000b), la forma completamente glicosilada de OATP8 humano tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 120 kDa, las bandas con peso molecular aparente inferior detectadas por el anticuerpo SKT resultaban de las formas infraglicosiladas de OATP8. En las células MDCKII transfectadas con el vector de control (MDCK-Co) no pudo detectarse la expresión de OATP8 ni de MRP2 humanos (Fig. 1).

La localización celular de los transportadores recombinantes en los transfectantes se estudió por medio de inmunofluorescencia y microscopía de confocal de barrido láser. En las células MDCK-OATP8, podía tefirse OATP8 con el anticuerpo SKT en la membrana basolateral (Fig. 2A y D). En estas células, se observó también cierta tinción intracelular de OATP8. Experimentos de doble marcación utilizando el anticuerpo SKT y DiOC₆(3) que tiñe

específicamente el retículo endoplásmico (Terasaki *et al.* 1984) indicaban que la fracción intracelular de OATP8 estaba localizada en el ER (no representado). La localización parcial en ER de OATP8 corresponde a su biogénesis y es consistente con la existencia de OATP8 infraglicosilado observada en los análisis de inmunotransferencia (Fig. 1B). En las células MDCK-MRP2/OATP8, MRP2 estaba localizada en la membrana apical, además de la aparición lateral de OATP8 (Figs. 2B, C, E y F). Fig. 2B muestra una imagen enfocada en el plano de los núcleos donde únicamente OATP8 era visible en este plano. Fig. 2 C muestra una imagen enfocada en la parte superior de las células, donde podía observarse la tinción de MRP2. En secciones verticales, eran visibles tanto OATP8 como MRP2 (Fig. 2E y 2F). Fig. 3 muestra esquemáticamente el papel de ambos transportadores recombinantes en el transporte vectorial por la línea de células transfectadas respectiva.

10 Ejemplo 3: Transporte Transcelular de [³H]BSP Mediado por OATP8 y MRP2

La función de OATP8 y MRP2 humanos en las células de doble transfección se estudió por medida del transporte transcelular del anión orgánico [³H]BSP, un sustrato de OATP8 humano (König *et al.* 2000b, Cui *et al.* 2001). Así, las células MDCKII polarizadas cultivadas en insertos de membranas Transwell se incubaron con [³H]BSP a una concentración de 1 μM en los compartimientos basolaterales. En diferentes momentos, se midió la radiactividad acumulada en el compartimiento apical y en las células. Como se muestra en Fig. 4A, la acumulación intracelular de [³H]BSP era significativamente mayor en las células MDCKII transfectadas con cDNA de OATP8 solo (MDCK-OATP8) o a la vez con cDNA de OATP8 y MRP2 (MDCK-MRP2/OATP8) que en las transfectadas con el control (MDCK-Co) y en las células transfectadas con MRP2 (MDCK-MRP2), demostrando que OATP8 es necesario para la acumulación intracelular de [³H]BSP. Sin embargo, cuando se midió la radiactividad en el compartimiento apical, no pudo observarse transferencia significativa alguna de [³H]BSP desde los compartimientos basolaterales a los compartimientos apicales para las células MDCK-Co, MDCK-MRP2, y MDCK-OATP8 (Fig. 4B), mientras que podía observarse un transporte transcelular acusado de [³H]BSP en el caso de las células MDCK-MRP2/OATP8 (Fig. 4B). Fig. 4C demuestra una absorción total mayor de [³H]BSP (acumulación intracelular más transporte transcelular) por las células MDCK-MRP2/OATP8 que por las células MDCK-OATP8.

25 El transporte transcelular de [³H]BSP por las células MDCK-MRP2/OATP8 era un proceso vectorial, como se demuestra en Fig. 5A. Se observaba únicamente un transporte basolateral a apical de [³H]BSP, mientras que el transporte apical a basolateral era insignificante. Esto era de esperar a partir de la localización celular de OATP8 y MRP2 en los transfectantes dobles y por la unidireccionalidad del transporte mediado por MRP2 (Fig. 3).

30 El eflujo de [³H]BSP se determinó después de la incubación de las células MDCK-OATP8 y MDCK-MRP2/OATP8 con 1 μM [³H]BSP durante 30 min en el compartimiento basolateral. Como se muestra en Fig. 5B, [³H]BSP se liberaba de las células MDCK-OATP8 principalmente a través de la membrana basolateral, mientras que era exportado por las células MDCK-MRP2/OATP8 principalmente a través de la membrana apical. Cuando se comparó la radiactividad remanente en las células después de los experimentos de eflujo de 30 min, las células MDCK-MRP2/OATP8 exhibían un nivel intracelular de [³H]BSP significativamente menor que las células MDCK-OATP8, lo que indicaba la exportación eficiente por MRP2 en la membrana apical.

Ejemplo 4: BSP Propiamente Dicho y no su Conjugado con Glutación-S es Transportado por MRP2 en las Células MDCK de Doble Transfección

40 Estudios en hígado de rata demostraron que BSP es secretada a la bilis principalmente como conjugado con glutatión (Combs 1965; Klaassen y Plaa 1967). Para investigar si esto es cierto también para los transfectantes dobles, los inventores estudiaron la radiactividad en el compartimiento apical de las células MDCK-MRP2/OATP8 por radio-HPLC después de incubación de las células con 1 μM [³H]BSP en el compartimiento basolateral durante 30 min. La mayor parte de la radiactividad (> 98%) que se acumulaba en el compartimiento apical (Fig. 6B) y en las células (Fig. 6C) indicaba el mismo tiempo de retención (17 min) que la [3H]BSP *no conjugada* (Fig. 6A). Únicamente se observaba en el compartimiento apical un pequeño pico de [³H]BSP-SG (tiempo de retención 15 min) (Fig. 6B). Estos resultados sugieren que BSP es absorbida por OATP8 humano y es él mismo, en lugar de su conjugado con glutatión S, un sustrato para MRP2 durante el transporte celular. Para confirmar esta hipótesis, los inventores investigaron el transporte de [³H]BSP en vesículas de membrana dentro-fuera preparadas a partir de células HEK-MRP2 (células HEK293 transfectadas con MRP2 humana, Cui *et al.* 1999). Como se muestra en Fig. 7A, [³H]BSP era transportado dependiendo de ATP a las vesículas de membrana de las células HEK-MRP2. La acumulación de [³H]BSP en las vesículas de membrana de las células HEK-MRP2 era significativamente mayor que en las vesículas de membrana de las células HEK-Co transfectadas de control (Fig. 7B), demostrando que [³H]BSP es un sustrato para MRP2 humana. Se determinó un valor K_m de 12 μM de BSP en el caso de MRP2 (Fig. 7C).

Ejemplo 5: Transporte Transcelular de Otros Aniones Orgánicos

55 Se estudió también el transporte transcelular de otros aniones orgánicos que son sustratos tanto para OATP8 como para MRP2. [³H]leucotrieno C₄ (LTC₄), 17β-glucuronosil [³H]estradiol (E₂17βG), y [³H]deshidroepiandrosterona-sulfato (DHEAS) han sido ya identificados como sustratos de OATP8 (König *et al.* 2000b; Kullak-Ublick *et al.* 2001; Cui *et al.* 2001). Se ha demostrado que [³H]LTC₄ y [³H]E₂17βG son sustratos de afinidad alta para MRP2 (Cui *et al.* 1999). Los estudios de los autores de la presente invención identificaron también [³H]DHEAS como sustrato de MRP2 (Gologan, Leier, y Keppler, datos no publicados, 2001). Análogamente a [³H]BSP (Fig. 8A), los tres

compuestos eran transportados con velocidades mucho mayores a través de las células MDCK-MRP2/OATP8 que a través de las células MDCK-OATP8 o las células MDCK-Co (Fig. 8B, C, D). Fluo-3 es un compuesto fluorescente (Milita *et al.* 1989) y un buen sustrato para MRP2 (Nies *et al.* 1998). Al igual que los otros compuestos arriba mencionados, Fluo-3 se transportaba a través de la monocapa de células MDCK-MRP2/OATP8 con velocidad de

5 transporte mayor en comparación con la monocapa de células MDCK-OATP8 (Fig. 8E), lo que sugería que Fluo-3 es también un sustrato para OATP8 humana.

En Fig. 8F se estudió el transporte transcelular de [³H]colil-aurina (TC), que no es sustrato para OATP8 humano (König *et al.* 2000b, Cui *et al.* 2001) ni para MRP2 (Madon *et al.* 1997). Al contrario que los otros compuestos

10 testados, [³H]colil-aurina era transportada a través de las tres líneas de células MDCKII con una velocidad bastante alta, pero no se observó diferencia alguna en las velocidades de transporte entre las células MDCK-Co, MDCK-OATP8 y MDCK-MRP2/OATP8. La alta velocidad de transporte para [³H]colil-aurina por las células MDCK es probablemente resultado de la expresión de sistemas de transporte endógenos para las sales biliares.

Ejemplo 6: Inhibición del Transporte Transcelular de [³H]BSP

El compuesto hidrófobo CDNB que se cree entra en las células por difusión, se conjuga con glutatión en el interior

15 de la célula y es bombeado luego por la vía de MRP2 (Evers *et al.* 1998). Estas propiedades de CDNB permitieron a los autores de la presente invención diferenciar entre la absorción mediada por OATP8 y la exportación mediada por MRP2. Células MDCK transfectadas se preincubaron con concentraciones diferentes de CDNB a la temperatura ambiente durante 20 min antes de la medida del transporte transcelular de [³H]BSP. Como se muestra en Fig. 9A, la

20 acumulación intracelular y el transporte transcelular de [³H]BSP en las células MDCK-OATP8 no eran inhibidas por CDNB hasta una concentración de 50 μM. Sin embargo, CDNB ejercía un efecto completamente diferente sobre las células MDCK-MRP2/OATP8. La acumulación intracelular de [³H]BSP aumentaba, mientras que el transporte transcelular de [³H]BSP era inhibido notablemente por la preincubación con CDNB (Fig. 9B). Estos resultados indican que CDNB no afecta a la absorción mediada por OATP8, pero inhibe la exportación de [³H]BSP mediada por MRP2 después de la formación de dinitrofenilglutatión en el interior de las células.

Los autores de la presente invención han comunicado recientemente que la seroalbúmina humana (HSA) inhibe

25 potentemente la absorción de [³H]BSP mediada por OATP8, probablemente por fijar [³H]BSP con afinidad muy alta (Cui *et al.* 2001). Por ello, se estudió aquí el efecto de HSA sobre el transporte transcelular de [³H]BSP a través de los transfectantes MDCKII. En presencia de 5 μM HSA, la acumulación de [³H]BSP mediada por OATP8 en las células MDCK-OATP8 se suprimía casi por completo (Fig. 9C). Asimismo, en las células MDCK-MRP2/OATP8, la

30 acumulación de [³H]BSP era fuertemente inhibida por HSA (Fig. 9D). Como consecuencia, el transporte transcelular de [³H]BSP disminuía también en las células MDCK-MRP2/OATP8 (Fig. 9D).

La absorción de [³H]E₂17bG mediada por OATP8 en las células HEK293 transfectadas con OATP8 puede ser

35 inhibida por los antibióticos rifampicina y rifamicina SV (Cui *et al.* 2001). Fig. 9 E-H demuestran que ambos antibióticos interfieren fuertemente con OATP8 y MRP2. Consistentemente con los estudios anteriores de los autores de la presente invención (Cui *et al.* 2001), ambos antibióticos inhibían la acumulación intracelular de [³H]BSP en las células MDCK-OATP8 (Fig. 9E y G). En cambio, en las células MDCK-MRP2/OATP8, la acumulación intracelular de [³H]BSP se reducía sólo hasta aproximadamente 50% del control, mientras que el transporte transcelular de [³H]BSP era inhibido más acusadamente por rifampicina y rifamicina SV (Fig. 9G y H). Estos resultados sugieren que ambos compuestos inhiben adicionalmente la exportación medida por MRP2. Esto se

40 confirma por estudios de transporte que utilizan vesículas de membrana procedentes de células HEK-MRP2. La rifampicina, a una concentración de 50 μM inhibía el transporte de [³H]LTC₄ a las vesículas de membrana HEK-MRP2 hasta 50% del control, y 50 μM rifamicina SV inhibía el transporte de LTC₄ a las vesículas de membrana HEK-MRP2 hasta 38% del control.

Ejemplo 7: Transporte Transcelular de Rifampicina

Dado que la rifampicina inhibe fuertemente tanto OATP8 como MRP2 humanos, los autores de la invención se

45 interesaron por conocer si el transporte transcelular de rifampicina propiamente dicha puede medirse utilizando los transfectantes dobles de la presente invención. Los inventores aprovecharon la ventaja de la absorción intensiva de rifampicina a 475 nm para determinar su concentración. Por este método pudo medirse una concentración de rifampicina tan baja como 1 μM. Como se muestra en Fig. 10, pudo observarse un transporte transcelular

50 significativamente mayor de rifampicina con las células MDCK-MRP2/OATP8 en comparación con las otras 3 líneas de células transfectantes MDCKII. Una concentración de rifampicina de aproximadamente 50 μM en estos experimentos era la mínima que pudieron utilizar los inventores para conseguir el transporte de rifampicina a los compartimientos apicales en una cantidad detectable por el método fotométrico.

Ejemplo 8: Líneas de Células Adicionales de Doble Transfección

Además de la línea de células doblemente transfectada MDCK-MRP2/OATP8 arriba descrita, se han generado dos

55 líneas de células de doble transfección adicionales de la misma manera: MDCK-OAT1/MRP2 y MDCK-OATP2/MRP2. La combinación del transportador de aniones orgánicos basolateral OAT1 (símbolo de gen: SLC22A6; Hosoyomada *et al.* 1999) y la bomba de exportación apical MRP2 representa un sistema modelo para

estudios sobre procesos de transporte renal. La combinación del transportador de aniones orgánicos basolateral OATP2 (Abe *et al.*, 1999; Hsiang *et al.*, 1999; König *et al.*, 2000a) y la bomba de exportación apical MRP2 representa un sistema modelo para estudios acerca de procesos de transporte hepático. La localización correcta de las proteínas de transporte recombinantes en las líneas de células de doble transfección se demostró por microscopía de inmunofluorescencia confocal de barrido láser (Fig. 11).

5 **Ejemplo 9: Transporte Transcelular de para-Amino-hipurato**

La actividad de transporte de la línea de células doblemente transfectada MDCK-OAT1/MRP2 se estudió por el uso del compuesto modelo ampliamente utilizado para-aminohipurato (PAH). PAH ha sido utilizado para estudios acerca de la secreción renal de aniones orgánicos. En los epitelios de los túbulos renales proximales, PAH es absorbido de la sangre en la membrana basolateral por OAT1 (Hosoyamada *et al.*, 1999). Subsiguientemente, PAH es secretado dependientemente de ATP por MRP2 (Leier *et al.*, 1999) en la orina. Como se demuestra en Fig. 12, la tasa de transporte transcelular de PAH es significativamente mayor en la línea de células doblemente transfectada MDCK-OAT1/MRP2 que en la línea de células transfectada de control MDCK-Co y en la línea de células simplemente transfectada MDCK-OAT1.

15 **Ejemplo 10: Transporte Transcelular de BSP**

La actividad de transporte de la línea de células doblemente transfectada MDCK-OATP2/MRP2 se estudió por el uso del compuesto modelo BSP. Como se demuestra en Fig. 13, la tasa de transporte transcelular de BSP es significativamente mayor en la línea de células doblemente transfectada MDCK-OATP2/MRP2 que en la línea de células transfectada de control MDCK-Co y en la línea de células simplemente transfectada MDCK-OATP2.

20 **Referencias**

- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S y Yawo H (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274:17159-17163.
- Acocella G (1978) Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacokinet* 3:108-127.
- 25 Allen L, Meck R and Yunis A (1980) The inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase from human pancreatic carcinoma cells by (alpha S,5S)-alpha-amino-3-chloro-4, 5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125; NSC-163501). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 27:175-182.
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92:1295-1302.
- 30 Büchler M, König 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.
- Combes B (1965) The importance of conjugation with glutathione for sulfobromophthalein sodium (BSP) transfer from blood to bile. *J Clin Invest* 44: 1214-1222.
- 35 Cui Y, König J, Buchholz JK, 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.
- Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U and Keppler D (2001) Hepatic Uptake of Bilirubin and Its Conjugates by the Human Organic Anion Transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 276:9626-9630.
- 40 Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, Paulusma CC, Oude Elferink RP, Baas F, Schinkel AH, and Borst P (1998) Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 101:1310-1319.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF and Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273:10046-10050.
- 45 Hori R, Okamura M, Takayama A, Hirozane K and Takano M (1993) Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am J Physiol* 264:F975-980.
- Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y and Endou H (1999) Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 276:F122-128.
- 50 Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP and Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting

- polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274:37161-37168.
- Ishizuka H, Konno K, Shiina T, Naganuma H, Nishimura K, Ito K, Suzuki H and Sugiyama Y (1999) Species differences in the transport activity for organic anions across the bile canalicular membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1324-1330.
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T and Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 272:G16-22.
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T and Sugiyama Y (1998) Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J Biol Chem* 273:1684-1688.
- Jansen PL (2000) Foreword: from classic bile physiology to cloned transporters. *Semin Liver Dis* 20:245-250.
- Jansen PL, Groothuis GM, Peters WH and Meijer DF (1987) Selective hepatobiliary transport defect for organic anions and neutral steroids in mutant rats with hereditary-conjugated hyperbilirubinemia. *Hepatology* 7:71-76.
- Keppler D and Arias IM (1997) Hepatic canalicular membrane. Introduction: transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J* 11:15-18.
- Keppler D, Jedlitschky G and Leier I (1998) Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol* 292:607-616.
- Keppler D and Kartenbeck J (1996) The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmrat* gene. *Prog Liver Dis* 14:55-67.
- Klaassen CD and Plaa GL. (1967) Species variation in metabolism, storage and excretion of sulfobromophthalein. *Am J Physiol* 213:1322-1326.
- König J, Cui Y, Nies AT and Keppler D (2000a) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G156-G164.
- König J, Cui Y, Nies AT and Keppler D (2000b) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275:23161-23168.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I and Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461:377-394.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B and Meier PJ (2000) Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20:273-293.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ and Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533.
- Leier I., Hummel-Eisenbeiss J., Cui Y, Keppler D. (2000), ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2, *Kidney Int.* 57: 1636-1642
- Li L, Lee TK, Meier PJ and Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for *oatp1*, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 273:16184-16191.
- Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B and Meier PJ (1997) Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 406:75-78.
- Minta A, Kao JP and Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264:8171-8178.
- Nies AT, Cantz T, Brom M, Leier I and Keppler D (1998) Expression of the apical conjugate export pump, *Mrp2*, in the polarized hepatoma cell line, WIF-B. *Hepatology* 28:1332-1340. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271:1126-1128.
- Scharschmidt BF, Waggoner JG and Berk PD (1975) Hepatic organic anion uptake in the rat. *J Clin Invest* 56:1280-1292.

- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF and Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 10:1159-1169.
- 5 Snel CA, Pang KS and Mulder GJ (1995) Glutathione conjugation of bromosulphophthalein in relation to hepatic glutathione content in the rat in vivo and in the perfused rat liver. *Hepatology* 21:1387-1394.
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM and Thompson RJ (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20:233-238.
- 10 Suzuki H and Sugiyama Y (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis* 18:359-376.
- Terasaki M, Song J, Wong JR, Weiss MJ and Chen LB (1984) Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38:101-108.
- 15 Tojo A, Sekine T, Nakajima N, Hosoyamada M, Kanai Y, Kimura K and Endou H (1999) Immunohistochemical localization of multispecific renal organic anion transporter 1 in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 10:464-471.
- Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ and Ling V (2001) Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2011-2016.
- 20 Whelan G, Hoch J and Combes B (1970) A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium. *J Lab and Clin Med* 75:542-557.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una línea de células de mamífero doblemente transfectada, transfectada de manera estable con (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos enlazada operativamente con un promotor y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos enlazada operativamente con un promotor, en donde el transportador de absorción para aniones orgánicos se expresa en la membrana basolateral y la bomba de exportación se expresa en la membrana apical.
- 10 2. La línea de células de la reivindicación 1, en la cual la línea de células se obtiene por transfección estable con (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos enlazada operativamente con un promotor presente en un vector o virus recombinante y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos enlazada operativamente con un promotor presente en un vector o virus recombinante.
- 15 3. La línea de células de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que es una línea de células caninas o humanas y las secuencias de DNA de (a) y/o (b) son humanas.
4. La línea de células de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es una línea de células de riñón.
5. La línea de células de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la cual el transportador de absorción para aniones orgánicos en un miembro del subgrupo 21A o 22A de la superfamilia de portadores de solutos (SLC).
6. La línea de células de la reivindicación 5, en la cual el transportador de absorción para aniones orgánicos es OAT1 (SNC22A6), OATP2 (SLC21A6), OATP8 (SLC21A8), u OATP-B (SLC21A9).
- 20 7. La línea de células de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la cual la bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos es un miembro del subgrupo MDR (ABCB) o el subgrupo MRP (ABCC) de la superfamilia ABC.
8. La línea de células de la reivindicación 7, en la cual la bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos es la bomba de exportación de sales biliares BSEP (ABCB11) o la proteína 2 de resistencia a multifármacos (MRP2; ABCC2).
- 25 9. La línea de células de la reivindicación 1, en la cual la secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos y/o la secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos están enlazadas operativamente con un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (pCMV).
- 30 10. Un proceso para la producción de una línea de células doblemente transfectada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que está transfectada de manera estable con (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos enlazado operativamente con un promotor y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos enlazada operativamente con un promotor, que comprende los pasos de:
 - 35 - transfectar las células con ambas secuencias de DNA de (a) y (b); y
 - seleccionar los transfectantes que expresan dicho transportador de absorción para aniones orgánicos y dicha bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos.
- 40 11. El uso de una línea de células polarizadas de doble transfección para analizar la interferencia de un fármaco candidato con el transporte de sustancias que se producen o existen naturalmente en el cuerpo, en el cual la línea de células está transfectada de manera estable con (a) una secuencia de DNA que codifica un transportador de absorción para aniones orgánicos enlazado operativamente con un promotor y (b) una secuencia de DNA que codifica una bomba de exportación para aniones orgánicos o conjugados aniónicos enlazada operativamente con un promotor.
- 45 12. El uso de la reivindicación 11, en el cual el transporte de las sustancias es transporte hepático o renal de aniones orgánicos.
13. El uso de una línea de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12 para la identificación de un sustrato de transporte o un inhibidor de transporte.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el inhibidor de transporte es un fármaco candidato.
- 50 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en el cual la identificación de un sustrato de transporte o un inhibidor del transporte se lleva a cabo como cribado de alta capacidad.

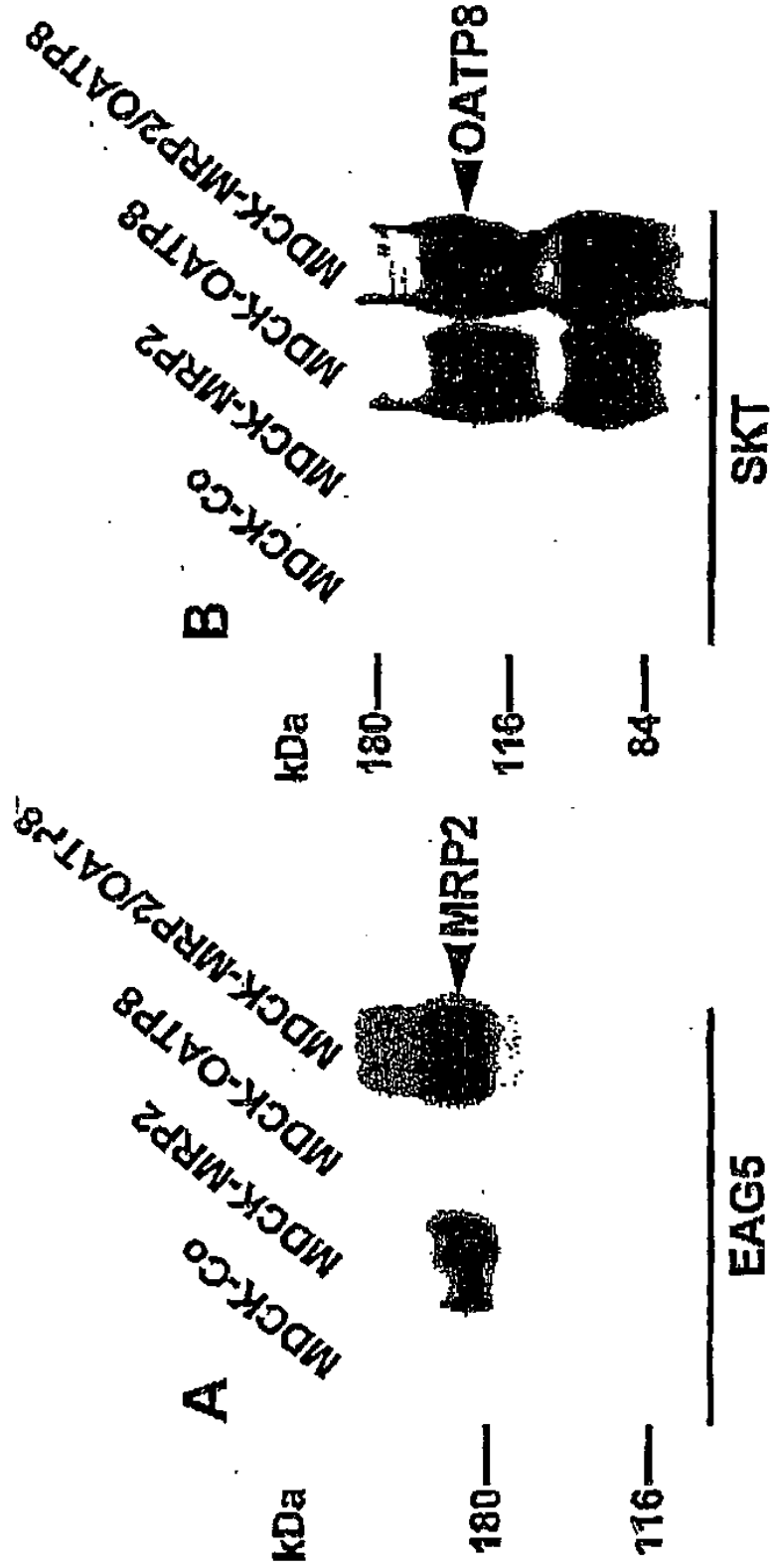


Fig. 1.

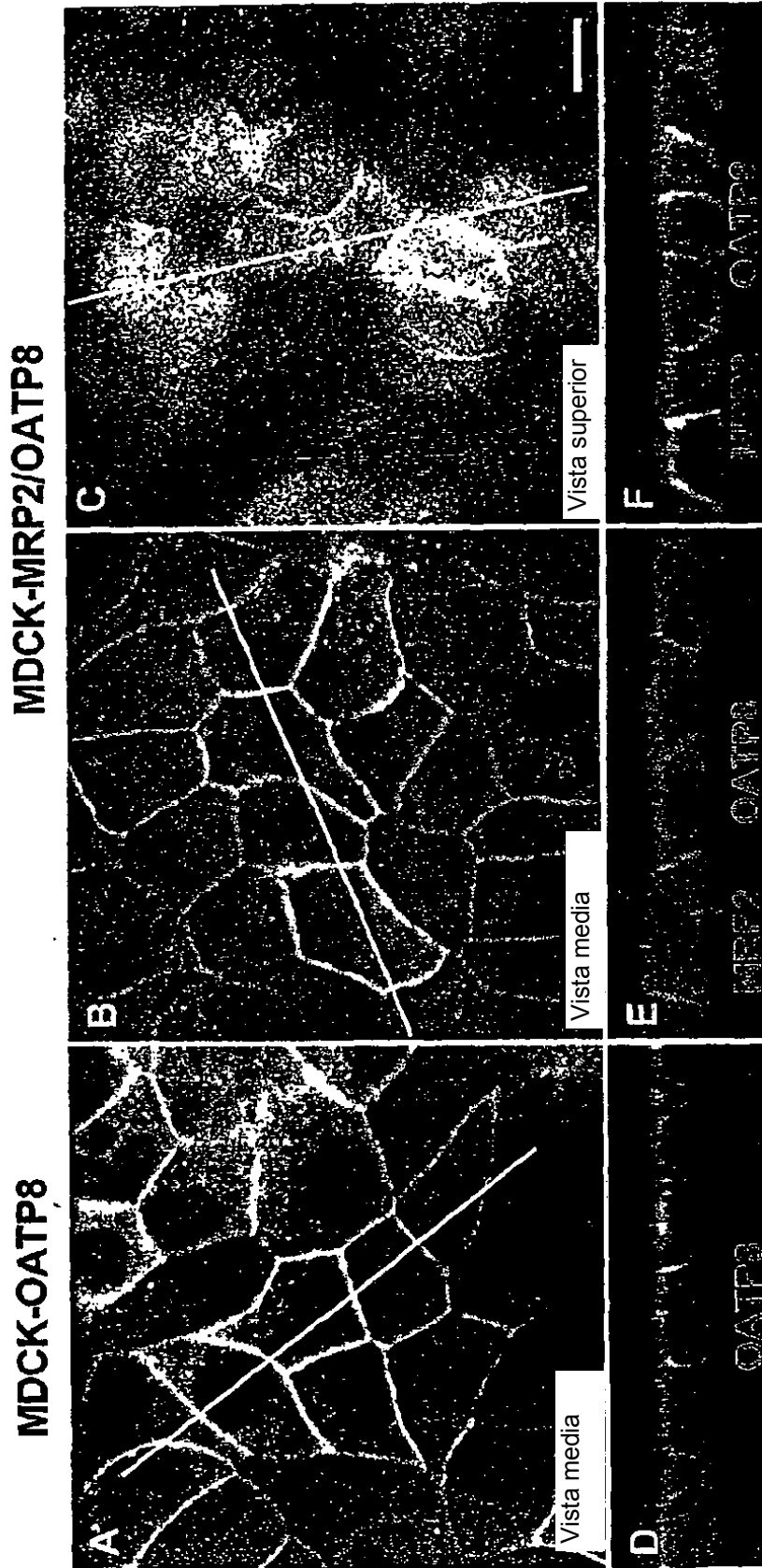


Fig. 2.

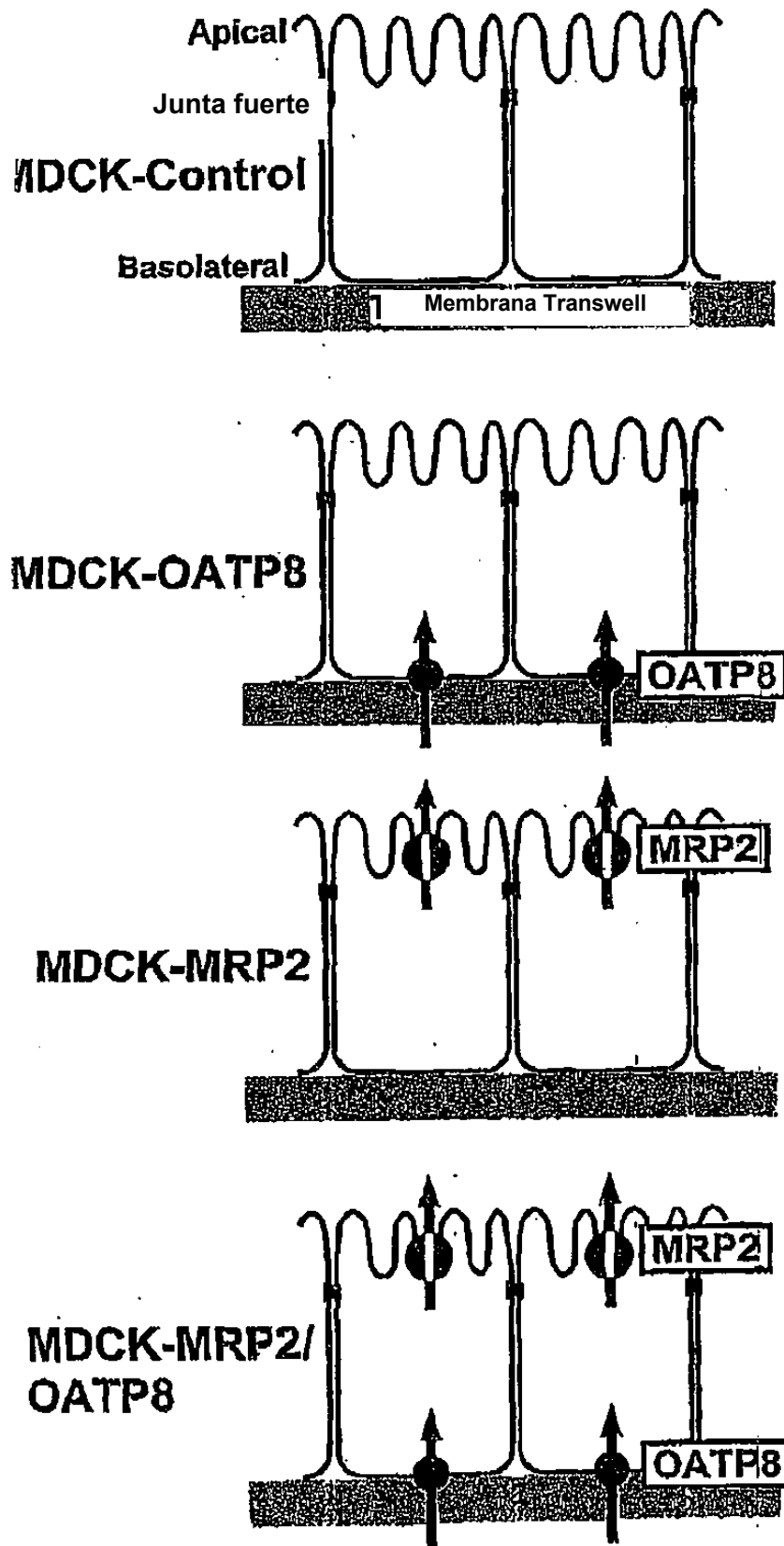


Fig. 3

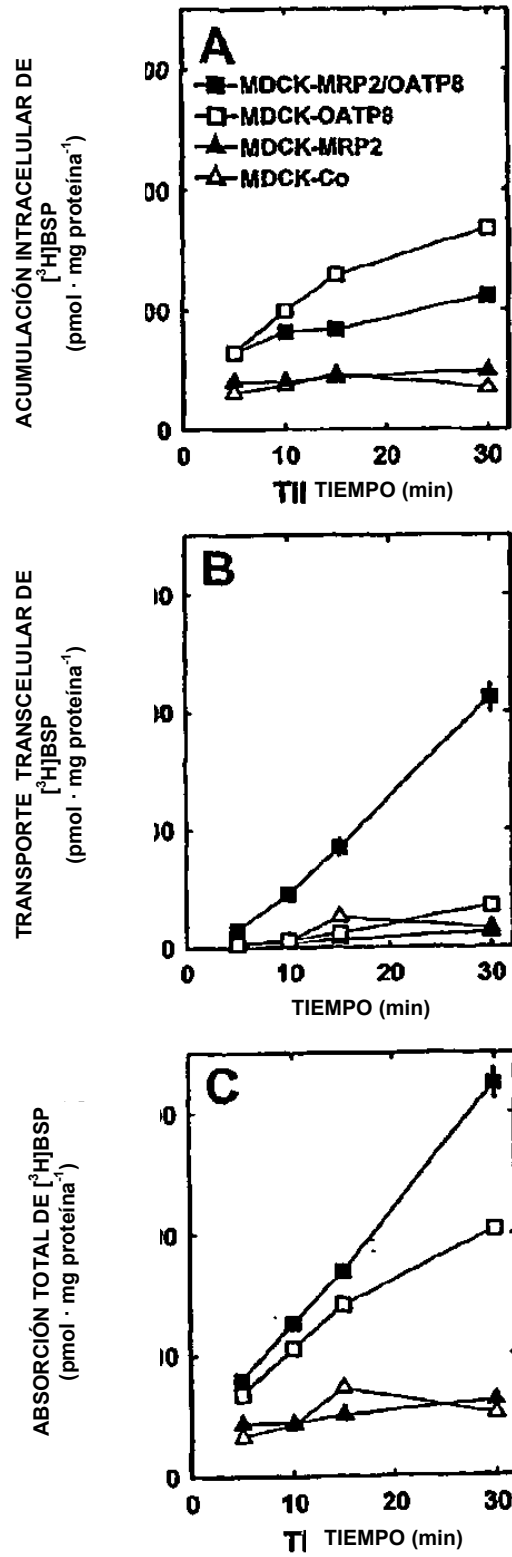


Fig. 4.

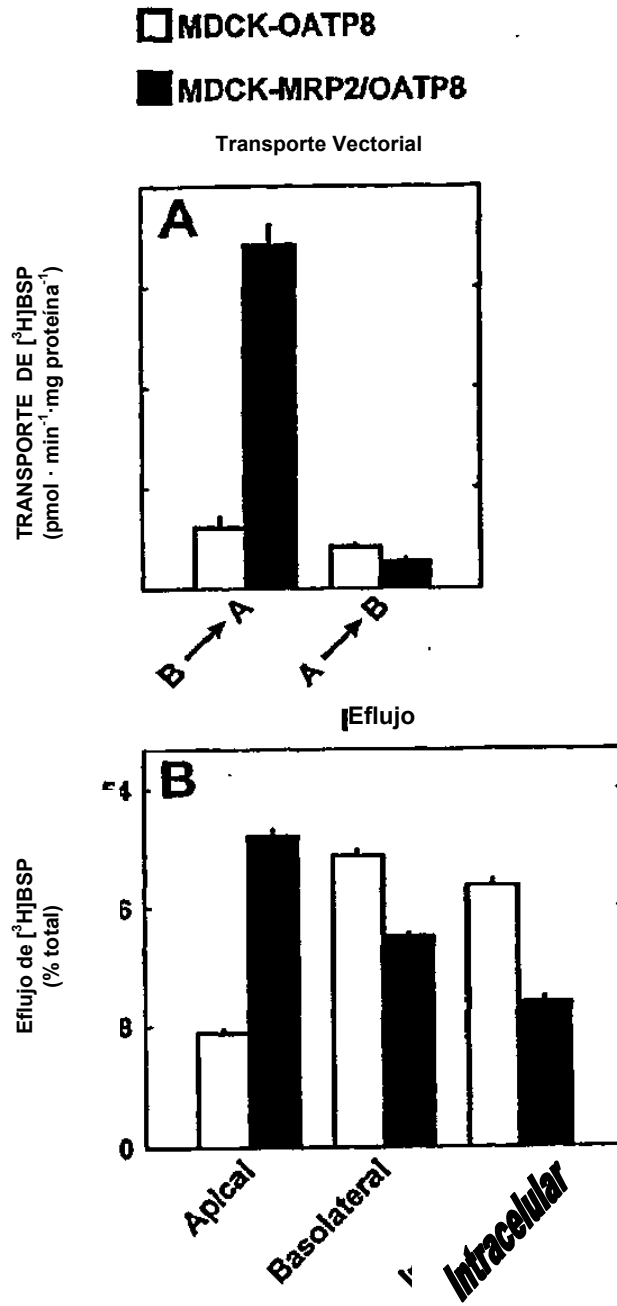


Fig. 5.

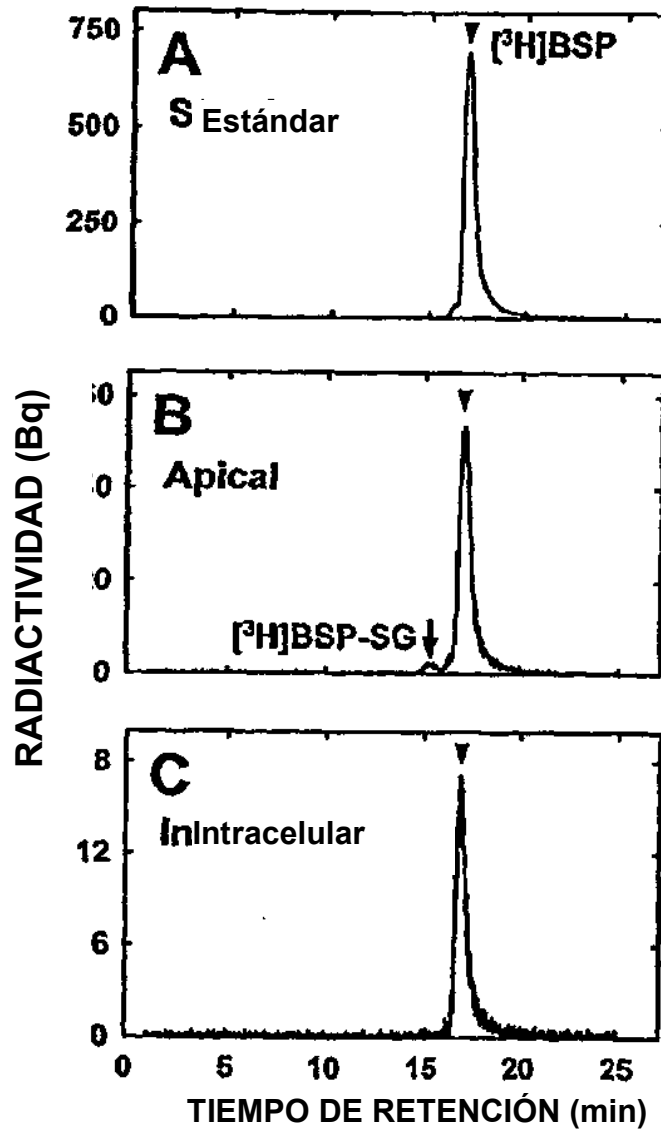


Fig. 6.

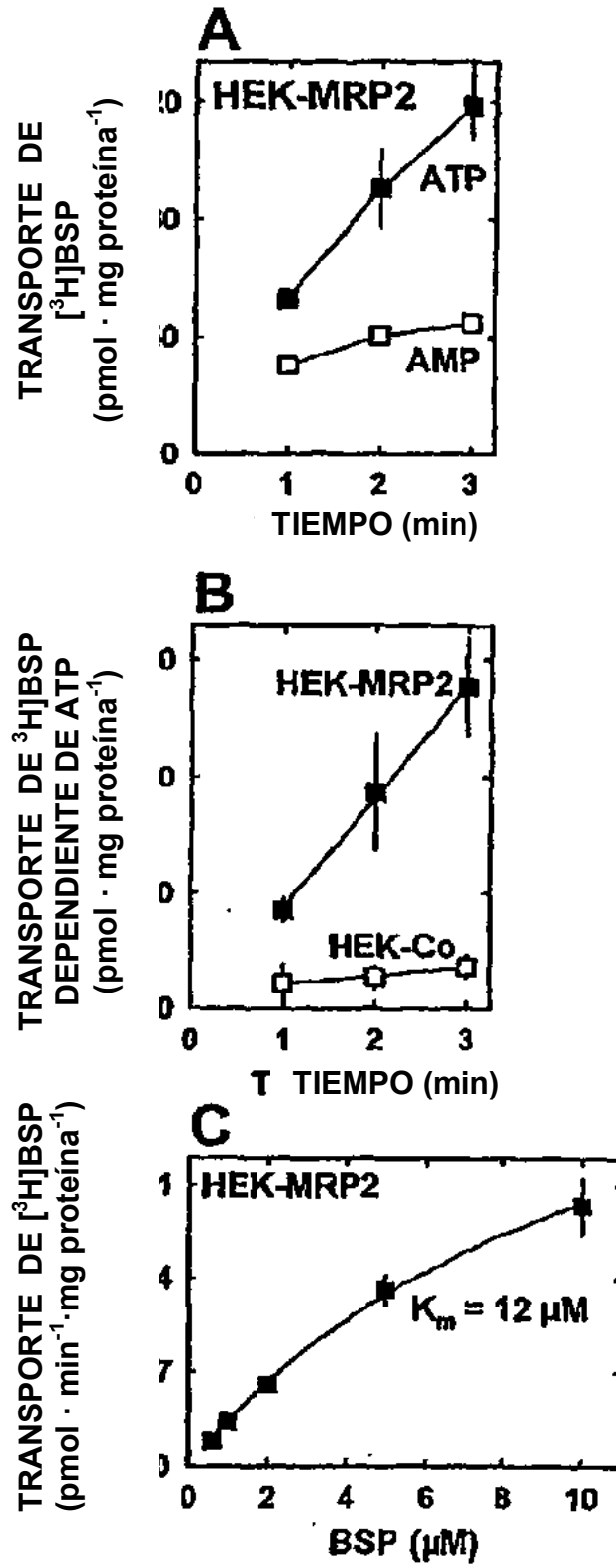


Fig. 7.

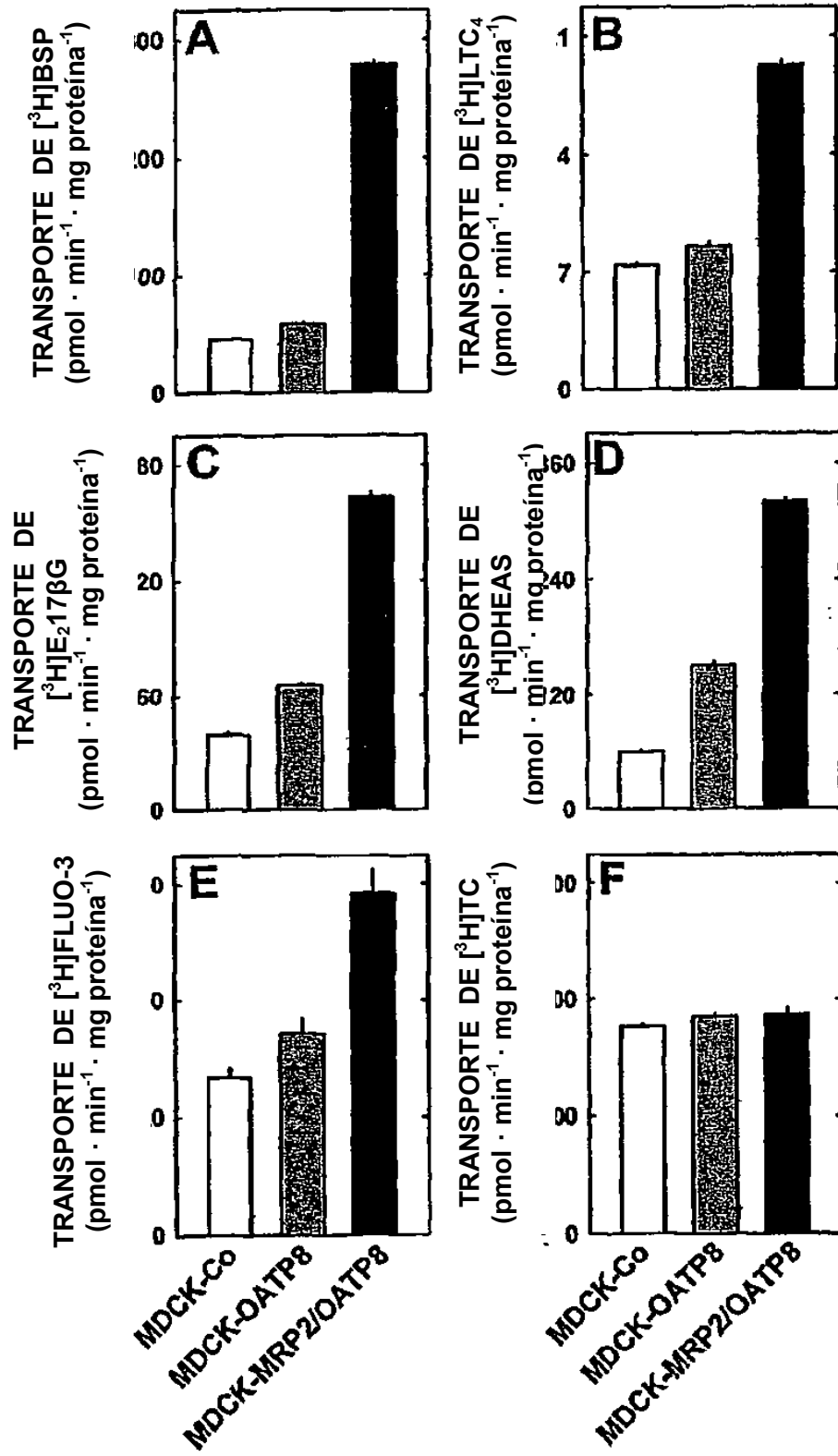


Fig. 8.

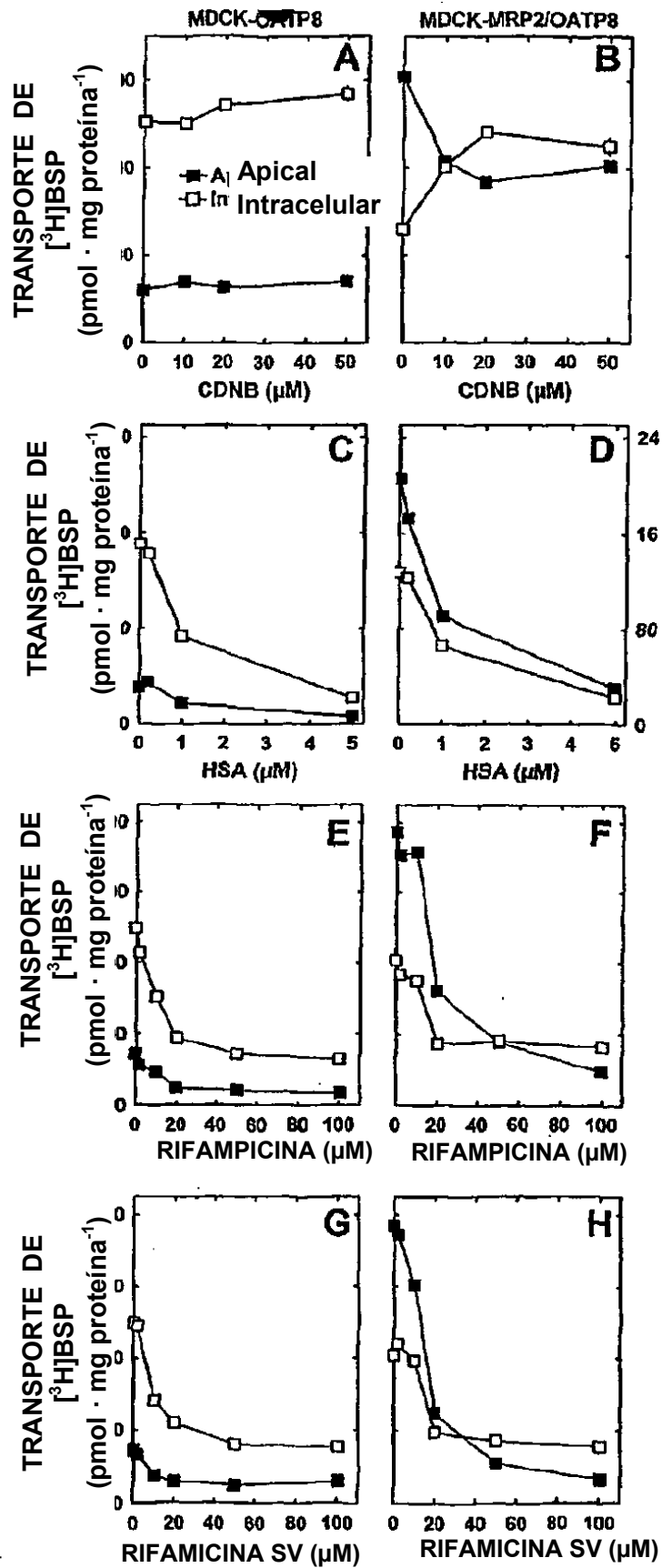
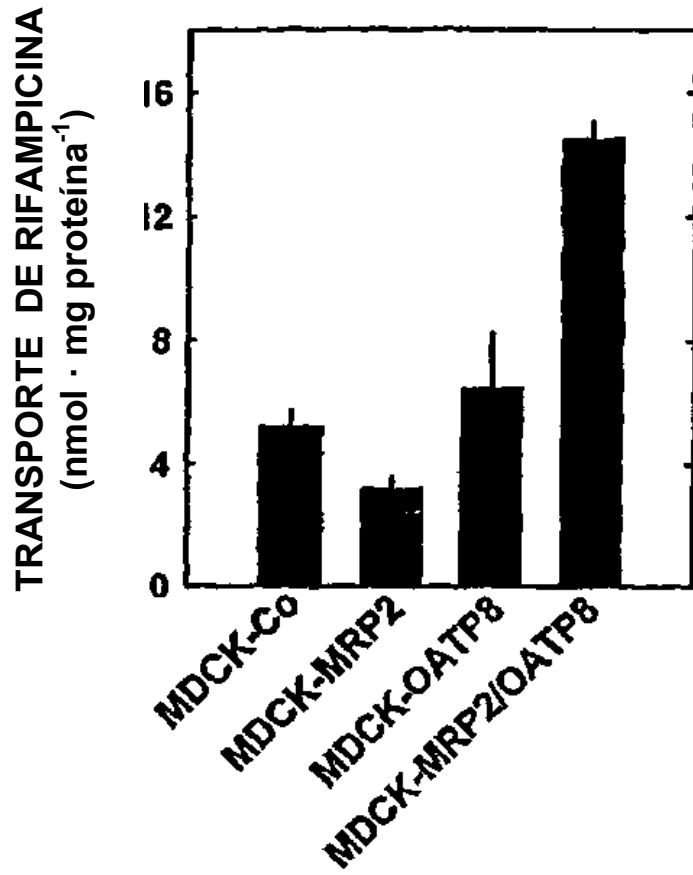


Fig.9



. Fig. 10.

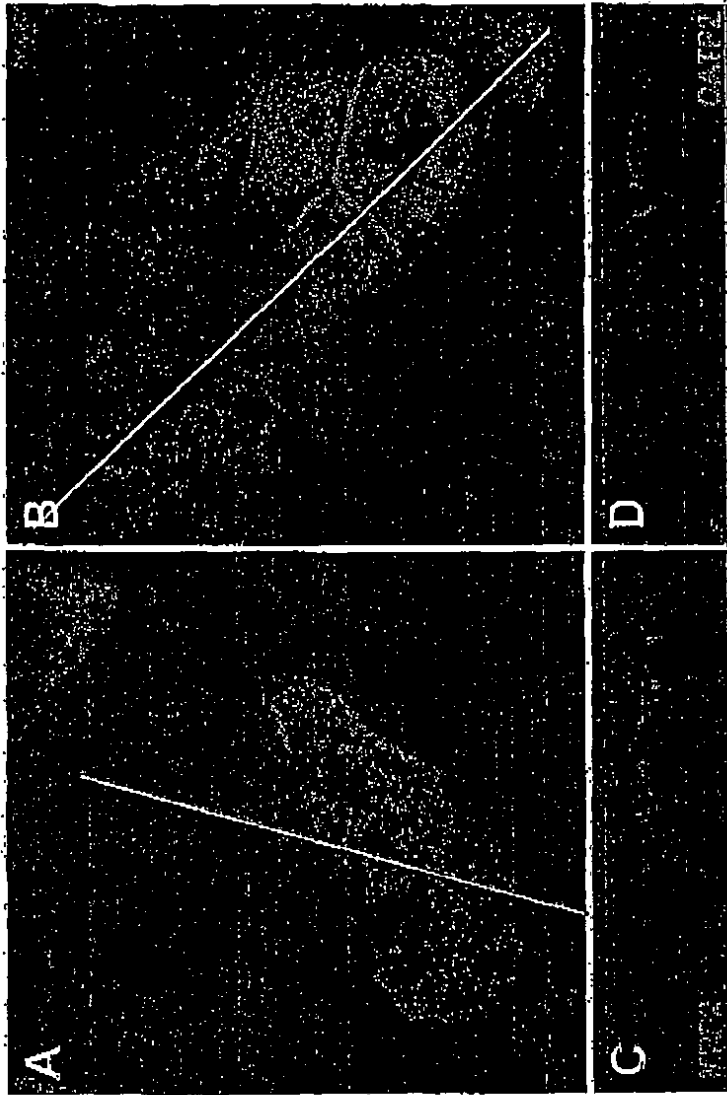


Fig. 11.

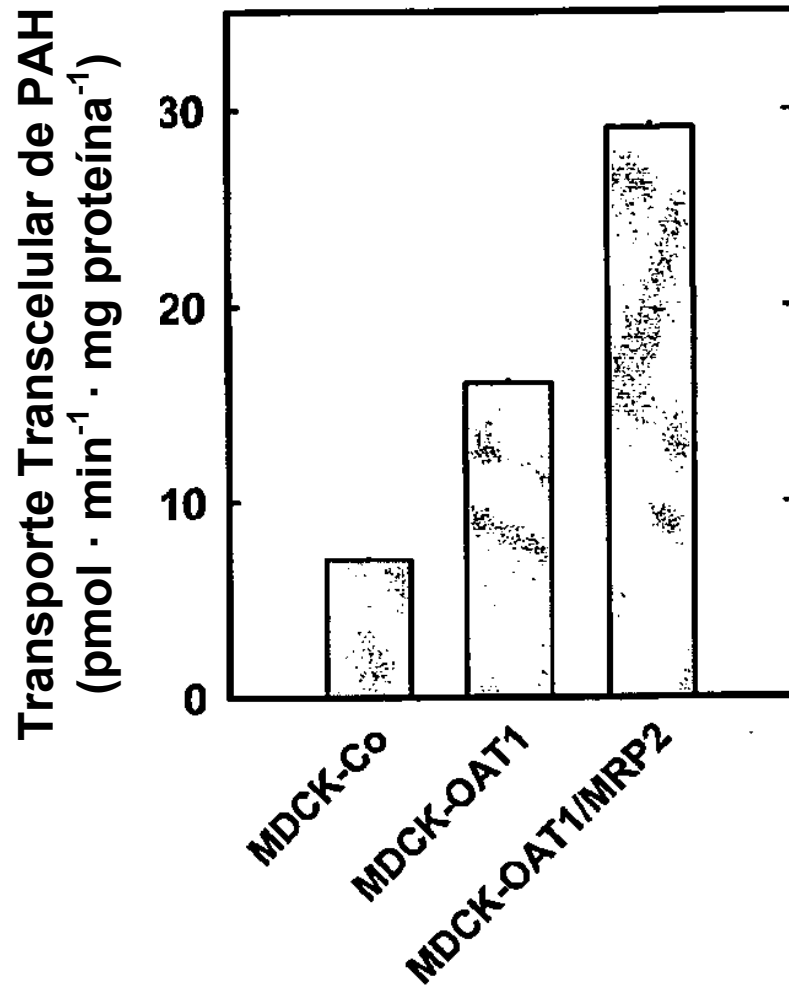


Fig. 12.

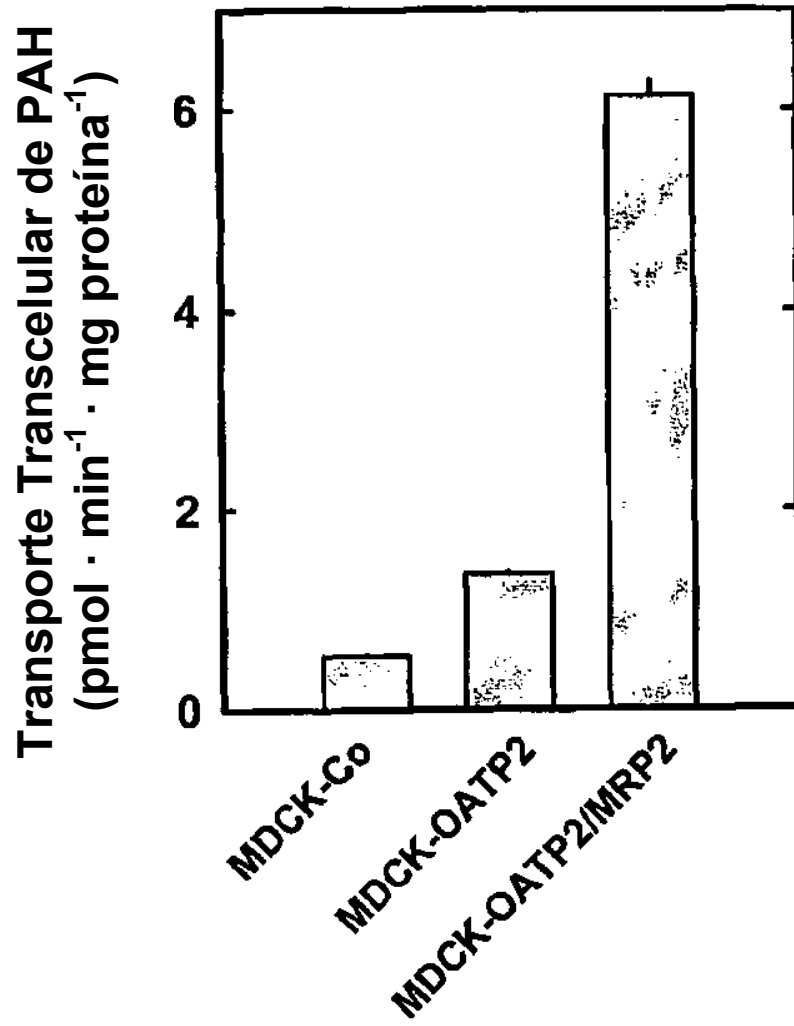


Fig. 13.