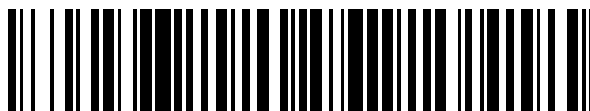


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 218**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2007** **E 07733858 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2021461**

54 Título: **Sistema de ensayo para proteínas transportadoras**

30 Prioridad:

12.05.2006 HU 0600408
27.09.2006 HU 0600754

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2014

73 Titular/es:

SOLVO BIOTECHNOLOGY (100.0%)
Közép fasor 52
6726 Szeged, HU

72 Inventor/es:

BÁTHORI, GYÖRGY;
MÉHN, DÓRA;
PÁL, ÁKOS;
KRAJCSI, PÉTER;
SZENTE, LAJOS;
FENYVESI, ÉVA;
TELBISZ, ÁGNES;
SARKADI, BALÁZS;
VÁRADI, ANDRÁS;
GEDEY, SZILVIA;
GLAVINAS, HRISTOS;
KIS, EMESE;
NAGY, TÜNDE;
NÉMETH, ATTILA y
MOLNÁR, ÉVA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 459 218 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

Sistema de ensayo para proteínas transportadoras

La invención proporciona una nueva preparación de membranas de células de insectos cargadas con colesterol que tiene un mayor nivel de colesterol en comparación con los niveles de colesterol fisiológicos de las membranas de células de insectos o preparaciones de membranas de células de insectos de control sin carga de colesterol, en donde dicha preparación de membranas cargadas con colesterol comprende una proteína transportadora ABC que tiene una mayor actividad de transporte de sustrato debido al mayor nivel de colesterol de la membrana. La invención se refiere también a kits de reactivos que comprenden las preparaciones de la invención. La invención se refiere también a métodos para la fabricación de dicha preparación y a métodos para medir cualquier tipo de actividad de los transportadores ABC presentes en las membranas cargadas con colesterol, a métodos para estudiar o analizar compuestos y la interacción de los compuestos y los transportadores ABC en este sistema de ensayo, así como a métodos para aumentar la actividad de transporte de sustrato de los transportadores ABC aumentando el nivel de colesterol de las membranas. La invención proporciona también un sistema de ensayo útil para analizar si las proteínas transportadoras ABC pueden ser activadas por colesterol en una membrana de células de insectos.

Técnica anterior

Proteínas transportadoras ABC

Las proteínas de la superfamilia de transportadores casete de unión a ATP (abreviadamente ABC, por la expresión inglesa *ATP binding cassette*) forman la mayor familia de proteínas transmembránicas. La mayor parte de ellas son proteínas transportadoras que utilizan la energía de hidrólisis de ATP para bombear sustratos a través de membranas intra- y extra-celulares. El transporte en la mayoría de los casos es unidireccional; los eucariotas efluyen generalmente sustratos desde el citoplasma hasta la matriz extracelular. La familia de transportadores incluye muchos miembros (actualmente se conocen 49 proteínas ABC humanas) que se clasificaron después de un análisis filogenético en 7 subfamilias (desde ABCA-ABCG) [Dean, M, Rzesky, A és Allikmets R., "The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily", *Genome Res.* 2001 11, 1156-1166]. Los transportadores ABC desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la salud y el funcionamiento del cuerpo. Su deficiencia o mal funcionamiento pueden conducir a enfermedades, como las enfermedades hereditarias. La investigación que se centra en su papel fisiológico se encuentra todavía en una etapa relativamente temprana.

Dentro de la superfamilia de transportadores ABC, varios transportadores actúan como un transportador resistente a multifármacos. Los transportadores resistentes a multifármacos son proteínas transportadoras capaces de extruir desde la célula por transporte activo una variedad de compuestos xenobióticos, incluyendo los fármacos. En muchos casos el aumento de su actividad puede conducir a la resistencia frente a la terapia con fármacos. Se ha demostrado que varios miembros de la familia de transportadores, por ejemplo, MDR1, MRP1 y ABCG2 (MXR/BCRP) desempeñan un papel en el desarrollo de la resistencia a fármacos. Los transportadores influyen significativamente en la cinética de absorción de los fármacos, incluso sin sobreexpresión ni amplificación de la actividad. Como varios fármacos son sustratos de un transportador multifármacos, durante el desarrollo de los fármacos es de importancia crucial excluir del círculo de moléculas candidatas al fármaco potencial las que pueden ser sustratos de dichos transportadores, ya en una fase temprana (ADME tempranas, siendo ADME un acrónimo de "Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción").

Ensayos para el estudio de los transportadores de membranas

Los transportadores de membranas se estudian habitualmente en ensayos celulares o a base de membranas. Para los ensayos de membranas los transportadores de interés se sobreexpresan en sistemas celulares y después de la expresión de los transportadores, se aíslan de estas células preparaciones de membranas. Para la expresión de las proteínas se aplican con frecuencia sistemas de expresión basados en células de insectos, como el sistema de insectos-Baculovirus. Las células de insectos proceden frecuentemente de las células de ovario de la polilla, *Spodoptera frugiperda*: un ejemplo son las células Sf9.

Por lo tanto, los métodos para la investigación de los transportadores ABC son particularmente importantes; para este fin se aplican usualmente ensayos de membranas. Solvo, la firma solicitante es también distribuidora de varios ensayos de membranas que son adecuados para estudiar las interacciones entre los transportadores y los fármacos candidatos o principales. Solvo ha desarrollado un ensayo de membranas utilizando membranas procedentes de células de mamíferos que expresan ABCG2 (MXR-M).

La actividad del transporte se suele medir: i) bien por la tasa de consumo de ATP, ii) o se monitoriza el transporte de sustratos marcados. En los ensayos de ATPasa (i) el transporte en sí no se mide directamente, sino por medio de la estimulación por el sustrato de la actividad de ATPasa, debido a que los sustratos transportados mejoran la actividad de la ATPasa por lo que se denominan también activadores. Entre ensayos de transporte (ii) la determinación del transporte vesicular es particularmente importante en el estudio de los transportadores. En este ensayo se utilizan vesículas inversas de membranas celulares de insectos; y el sustrato es transportado a la vesícula, donde se acumula y se puede detectar.

Es de importancia fundamental que los modelos *in vitro* imiten estrechamente el fenotipo fisiológico.

Las membranas preparadas a partir de sistemas de expresión de seres humanos u otros mamíferos han sido ampliamente utilizadas en el campo de los transportadores ABC. Desgraciadamente, estos sistemas de expresión proporcionan generalmente niveles de expresión significativamente menores que son insuficientes para medir la actividad de ATPasa del transportador. Por otra parte, mientras que el transportador que se va a ensayar debe ser sobreexpresado, otros transportadores expresados por la célula hospedante de mamífero pueden contribuir a un fondo o dar como resultado un efecto perturbador, en particular, si se solapan las especificidades del sustrato de las proteínas transportadoras.

Sistemas de expresión de células de insectos más robustos proporcionan por lo general mayores tasas de expresión y tienen la clara ventaja de estar libres de otros transportadores, por lo tanto se puede estudiar uno y sólo un tipo de proteína transportadora. Los ensayos basados en preparaciones de membranas de células de insectos son particularmente preferidos por ser estables, fiables, fáciles de manipular y se ofrecen con frecuencia varios formatos de ensayo (ATPasa estimulada por sustratos, transporte vesicular y/u oclusión de nucleótidos).

Sin embargo, ensayos basados en preparaciones de células de insectos y en membranas de células de insectos, eficaces y convenientes por otra parte, muestran ciertas diferencias perturbadoras en comparación con los ensayos basados en células de mamíferos, lo que cuestiona su valor como un sistema de ensayos útil y relevante en el desarrollo de fármacos.

Está documentado que para ciertos transportadores ABC, por ejemplo, en el caso de MDR1 (ABCB1) así como de ABCG2, una alta actividad de ATPasa basal hace menos sensibles los ensayos de ATPasa estimulada por sustratos. Se ha sugerido que la actividad de ATPasa basal, medida en ausencia de sustratos añadidos, puede ser debida a la activación por sustratos endógenos, o puede reflejar una actividad de ATPasa parcialmente desacoplada del transportador [M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*, Nat Rev Cancer 2 (2002) 48-58; G. Szakacs, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, *Targeting multidrug resistance in cancer*, Nat Rev Drug Discov 5 (2006) 219-234].

Se observó una diferencia sorprendentemente grande en la actividad de los transportadores y en la sensibilidad para diferentes sustratos (sulfasalazina, topotecán, prazosina, mitoxantrona y metotrexato) entre los ensayos basados en membranas de células de insectos o de mamíferos. Se observaron una actividad moderada y una disminución de la sensibilidad al sustrato para activadores/sustratos para diversos transportadores expresados en membranas de Sf9. Para ciertos sustratos, el transportador no mostró actividad cuando se midió con vesículas procedentes de células de insectos.

Por ejemplo, en el caso del transportador ABCG2 de tipo natural (tn), a pesar de una actividad de ATPasa basal pronunciada, la estimulación por el fármaco sustrato en las membranas de las células Sf9 era relativamente pequeña. En contraste, en membranas aisladas de células de mamíferos, la actividad de ABCG2-ATPasa podría ser estimulada significativamente por diversos fármacos sustratos. También está documentado que la actividad de ATPasa de la proteína ABCG2 de tipo natural no podría ser estimulada por la prazosina, un sustrato de ABCG2 conocido, cuando se expresa en membranas de células de insectos [Ishikawa, T., Kasamatsu, S., Hagiwara, Y., Mitomo, H., Kato, R. and Sumino, Y. (2003) *Expression and functional characterization of human ABC transporter ABCG2 variants in insect cells*. Drug Metab Pharmacokinet 18: 194-202; Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A. and Sarkadi, B. (2001) *Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells*. Biochem Biophys Res Commun 285: 111-117].

Puesto que las proteínas de membrana, cuando se expresan en células Sf9 son subglicosiladas, se supuso que la pérdida de la glicosilación puede dar como resultado estas alteraciones de la actividad de ABCG2-ATPasa. Con respecto a ABCG2 se ha demostrado que la glicosilación no tiene ningún efecto sobre su actividad, procesamiento o localización en la membrana [K. Mohrmann, M.A. van Eijndhoven, A.H. Schinkel, J.H. Schellens, *Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*, Cancer Chemother Pharmacol 56 (2005) 344-350; N.K. Diop, C.A. Hrycyna, *N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane*, Biochemistry 44 (2005) 5420-5429].

Hasta el momento no se han realizado estudios directos para comparar las características bioquímicas de los transportadores expresados en sistemas de Sf9 y humanos.

Por lo tanto, existe la necesidad permanente en la técnica de ensayos de transportadores ABC basados en células de insectos y en particular basados en preparaciones de membranas de células de insectos que tengan mejor relevancia fisiológica y/o mejor eficacia.

Los inventores aplicaron una nueva propuesta cuando trataron de cargar membranas de células de insectos con colesterol.

Interacción del colesterol con los transportadores ABC

En cuanto a la interacción del colesterol con los transportadores ABC específicos, se ha sugerido anteriormente que MDR1 (ABCB1, P-glicoproteína o P-gp) se encuentra en el dominio de balsa/caveola y su actividad bajo ciertas condiciones depende del colesterol y se ha mostrado que este proceso es paralelo a la desaparición y aparición de caveolina-1 en fracciones de membrana agotadas y repletas, respectivamente [Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. "Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells" Mol Pharmacol. 2004 Nov; 66(5):1332-9]. Aparentemente en la técnica anterior, nada sugería, a nuestro conocimiento, que el efecto del colesterol se produciría en preparaciones de membranas de células de insectos, cuya composición de membrana es diferente.

En relación con este fenómeno, Kamau SW y colaboradores (In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2005 41(7) 207-16) han encontrado que el agotamiento de colesterol influye sobre la composición del lípido de membrana, modula la localización de P-gp y provoca su pérdida de función. La cantidad de P-gp en la membrana disminuyó como resultado del agotamiento de colesterol y se trasladó de la fracción de "balsa" a la fracción que tiene mayor densidad.

En la solicitud de patente de EE.UU. 6855812, Hanscom y colaboradores describen procedimientos basados en la P-glicoproteína. Aunque eran conscientes de que el colesterol influía sobre la expresión de los transportadores ABC específicos, no obstante no sugirieron ninguna diferencia en sus actividades y guardaron silencio sobre la aplicación de colesterol para aumentar la actividad de los transportadores ABC o la eficiencia de los ensayos de membranas.

De hecho, MDR1 es el transportador ABC en el que el efecto del colesterol sobre la actividad del transportador ha sido investigado de una manera más detallada y se ha encontrado que un aumento del nivel de colesterol daba como resultado un aumento de la actividad de ATPasa basal y que la actividad de ATPasa no estimulada por sustrato disminuiría la sensibilidad de un ensayo de transporte de sustrato [Garrigues, A., Escargueil, A.E. and Orlowski, S. (2002) *The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane*. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 10347-10352]. Se ha sugerido que el colesterol es un sustrato de ABCB1, una conclusión cuestionada últimamente [Le Goff, W., Settle, M., Greene, D.J., Morton, R.E. and Smith, J.D. (2006) *Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis*. J Lipid Res 47: 51-58].

Szakács, Gergely et al. [Szakács G., Langmann T., Özvegy Cs., Orsó E., Schmitz G., Váradi A. and Sarkadi B. (2001) "Characterization of the ATPase Cycle of Human ABCA1: Implications for Its Function as a Regulator Rather Than an Active Transporter" BBRC 288, 1258-1264] no han detectado ninguna actividad de ATPasa significativa en las membranas de Sf9 que contenían ABCA1. Los inventores también observaron que "no había ningún cambio en la actividad de ATPasa cuando se añadieron colesterol (10-100 µg/mL), liposomas de diversas mezclas de colesterol-lípidos (suspensiones de 1 mg/mL de liposomas...) a las membranas aisladas que contenían ABCA1. Por lo tanto, las preparaciones de membranas de células de insectos de este documento no muestran un aumento en la actividad de transporte de sustrato.

Se ha propuesto también para otros transportadores, que están localizados al menos parcialmente en sistemas de balsa/caveola. Yunomae y colaboradores sugirieron que el efecto inhibitorio de dimetil-beta-ciclodextrina sobre la función de P-gp y de MRP2 podría ser atribuido a la liberación de estos transportadores de las membranas apicales al medio como efectos secundarios por el agotamiento de colesterol en las caveolas mientras que no se producía ningún efecto sobre los niveles de mRNA. Por lo tanto, no se observó ningún efecto directo del colesterol sobre la actividad [Yunomae K, Arima H, Hirayama F, Uekama K. *Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells*. FEBS Lett. 2003 Feb 11; 536(1-3):225-31].

Entre los otros transportadores de membrana se investigó principalmente el transportador de colesterol ABCA1 conocido (ABCB1). Feng, Bo y Tabas, Ira (J. Biol. Chem. 2002 277(48) 43271-43280) han descrito que el eflujo de colesterol y fosfolípidos mediado por ABCA1 era inducido inicialmente en macrófagos cargados con colesterol, sin embargo, es inhibido más tarde con la acumulación de colesterol libre (no esterificado) (cuyo proceso va en paralelo con la progresión de las lesiones ateroscleróticas) y también disminuye el nivel de proteína ABCA1.

Diversas solicitudes de patentes [por ejemplo WO 00/18912 (Schmitz G and Klucken J.), la patente de EE.UU. 2004/0096851 (Wang N. et al.), la patente de EE.UU. 6617122 (Hayden M.R. et al.)] describen el efecto del colesterol sobre la expresión de diferentes transportadores ABC. Según nuestro conocimiento, sin embargo, ninguna de estas patentes describe ni incluso menciona que el colesterol propiamente dicho mejoraría la actividad de transporte.

En la patente de EE.UU. 2004/0185456, los autores (Deneffe P. y co.) en el ejemplo 17 de la descripción se describen ensayos para la identificación de agonistas y antagonistas de la proteína ABC1. Se aplican vesículas que contienen los sustratos de la proteína (por ejemplo, colesterol y fosfolípido). Sin embargo, no se hacen indicaciones sobre el efecto de los sustratos antes mencionados sobre la actividad de ABC1.

Janvilisri Tavan. et al. [Janvilisry T., Vener H., Shaki S., Reuteri G, Balakrishnan L., and Veen. van H. W., (2003) "Sterol Transport by the human Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Expressed in *Lactobacillus lactis*" J. Biol. Chem. 278(23) 20645-20651] enseñan que los esteroides, estradiol y colesterol, estimulaban la actividad de ATPasa asociada a BCRP; sin embargo, la presencia de estradiol inhibía significativamente el transporte mediado por BCRP de un sustrato en *L-lactis*. Por lo tanto, de hecho el efecto de los esteroides era inhibitorio de la actividad de transporte

de sustratos.

Por lo tanto, la única observación en la técnica con respecto al efecto del colesterol sobre la actividad de una proteína transportadora ABC, incluso si los resultados son algo contradictorios, se refiere a MDR1. No obstante, en todos estos experimentos parece que los autores utilizaron células de mamífero o membranas preparadas a partir de ellas. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, ninguno de los autores se refiere a la posible aplicación de colesterol para mejorar la actividad de los transportadores ABC, ni siquiera sugiere la necesidad de dicho procedimiento.

En un esfuerzo para mejorar el comportamiento de la membrana de células de insectos, los inventores decidieron comenzar con el único transportador ABC del que está documentado en la técnica que tiene posiblemente una capacidad de transporte sensible al colesterol, es decir, MDR1. Encontraron que la modulación del colesterol de la membrana sólo tenía un efecto insignificante sobre la actividad del transportador multifármaco MDR1. Necesariamente se llegó a la conclusión de que no era posible ninguna mejora de los ensayos basados en preparaciones de células de insectos o de membranas de células de insectos de los transportadores ABC aumentando la carga de colesterol de las membranas de células de insectos.

A pesar de los resultados desalentadores, los inventores fueron capaces inesperadamente de realizar preparaciones de membranas de células de insectos y células de insectos cargadas con colesterol que comprendían transportadores ABC que habían aumentado la actividad de transporte en dichas membranas cargadas con colesterol en comparación con las membranas de células de insectos que comprendían el nivel normal de colesterol.

En particular, los inventores encontraron inesperadamente que células de insectos o las preparaciones de membranas derivadas de ellas, construidas por sistemas de expresión en insectos que expresan transportadores ABC, como ABCG2 o BSEP (ABCB11) de tipo natural, pueden aumentar la actividad del transportador y/o su sensibilidad a ligandos aumentando el contenido de colesterol de la membrana. Los inventores encontraron que típicamente la carga de colesterol inducía la activación de los sistemas de ensayo basados en las membranas de las células Sf9 tanto en los ensayos de ATPasa estimulada por sustratos como en los ensayos de transporte vesicular.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a una preparación de membranas de células de insectos o preparación de células de insectos cargada con colesterol para el estudio de la interacción de un compuesto y una proteína transportadora ABC (casete de unión a ATP) por determinación de la actividad de dicha proteína transportadora ABC, comprendiendo dicha preparación un mayor nivel de colesterol en la membrana en comparación con el nivel de colesterol fisiológico del mismo tipo de membrana de células de insectos, comprendiendo dicha preparación de membranas de células de insectos o preparación de células de insectos una proteína transportadora ABC, en donde dicha proteína transportadora ABC es ABCG2 (proteína transportadora ABC G2) o ABCB11 (proteína transportadora ABC B11), teniendo dicha ABCG2 o ABCB11 una mayor actividad de transporte de sustrato en comparación con la actividad de transporte de sustrato de dicha proteína ABCG2 o ABCB11 si está presente en el mismo tipo de membrana de células de insectos con un nivel de colesterol fisiológico.

El término colesterol implica en la presente memoria un derivado de colesterol.

Preferiblemente, en las preparaciones de la invención, el nivel de colesterol es:

- al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 80% del nivel de colesterol correspondiente a una membrana de célula de mamífero,
- al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, muy preferiblemente al menos 6 veces el nivel de colesterol fisiológico de una membrana de célula de insecto,
- calculado como el contenido de colesterol con relación al contenido total de proteínas y es al menos 25 µg/mg de proteínas totales, preferiblemente al menos 50 µg/mg de proteínas totales.

Preferiblemente, la actividad de transporte de sustrato o la sensibilidad al sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11 se analiza por: a) un ensayo de transporte vesicular y/o b) un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato. Preferiblemente, la actividad de transporte de sustrato o la sensibilidad al sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11 es de manera significativa, preferiblemente al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, muy preferiblemente al menos 5 veces o incluso 10 veces mayor que la actividad de transporte de sustrato o la sensibilidad al sustrato de dicha proteína ABCG2 o ABCB11 si está presente en una preparación de membranas de células de insectos de control del mismo tipo con un nivel de colesterol fisiológico.

De acuerdo con una realización adicional, la invención se refiere a un kit de reactivos para determinar la actividad de una proteína ABCG2 o ABCB11, comprendiendo dicho kit:

- la preparación de acuerdo con la invención, y/o

- medios para expresar dicha ABCG2 o ABCB11 en células de insectos y medios para cargar las células de insectos con colesterol y opcionalmente medios para preparar una preparación de membranas de células de insectos, y
- si se desea, cualquiera de los siguientes: sustratos de la proteína ABCG2 o ABCB11, ATP, colesterol, tampones, reactivos, controles, inhibidores o activadores de la proteína ABCG2 o ABCB11.

La invención se refiere además a un método para la fabricación de una preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos que comprende una proteína ABCG2 o ABCB11 que tiene mayor actividad de transporte de sustrato o sensibilidad al sustrato, para uso en un ensayo de la proteína ABCG2 o ABCB11, en la que dicho método comprende:

- proporcionar una proteína ABCG2 o ABCB11 que tiene actividad de transporte de sustrato o sensibilidad al sustrato en una preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos,
- cargar la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos con colesterol aumentando de este modo el nivel de colesterol de la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos,
- analizar la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos cargada con colesterol obtenida para determinar el aumento de la actividad de transporte o de la sensibilidad al sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11 en comparación con la misma actividad en una preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos no cargada con colesterol del mismo tipo.

En una variante preferida del método de la invención:

- la preparación de membranas celulares se prepara a partir de células de insectos que comprenden la proteína ABCG2 o ABCB11, y
- la preparación de membranas celulares se incuba con un complejo de ciclodextrina y colesterol, y
- se retira el complejo que no se ha unido.

En una variante adicional del método:

- la proteína ABCG2 o ABCB11 se expresa en células de insectos,
- las células de insectos bien antes o durante la expresión de la proteína ABCG2 o ABCB11 se incuban con un complejo de ciclodextrina y colesterol,
- se retira el complejo que no se ha unido, y
- se prepara una preparación de membranas celulares a partir de células de insectos.

En una variante muy preferida del método:

- la proteína ABCG2 o ABCB11 se expresa en células de insectos,
- la preparación de membranas celulares se prepara a partir de células de insectos, que comprende al menos las siguientes etapas:
 - i) aislamiento de las membranas,
 - ii) homogeneización,
 - iii) incubación de la preparación homogeneizada con un complejo de ciclodextrina y colesterol; y
 - iv) ultracentrifugación.

Muy preferiblemente, el aumento de la actividad de transporte de sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11 se analiza por:

- a) un ensayo de transporte vesicular y/o
- b) un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato.

La invención se refiere también a una preparación de células de insectos o a una preparación de membranas de células de insectos que comprende un aumento del nivel de colesterol en comparación con el nivel de colesterol fisiológico de las membranas de células de insectos y una proteína ABCG2 o ABCB11 de mayor actividad de transporte de sustrato o sensibilidad al sustrato en comparación con la actividad de transporte de sustrato o sensibilidad

al sustrato de dicha proteína ABCG2 o ABCB11 en una membrana de células de insectos con contenido de colesterol fisiológico, en el que dicha preparación de células de insectos o dicha preparación de membranas de células de insectos se obtiene por el método de la invención.

5 La invención se refiere también a un método para aumentar la actividad de ABCG2 o ABCB11 aumentando el contenido o nivel de colesterol de una membrana que comprende la proteína ABCG2 o ABCB11. En este método, se pueden aplicar cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

La invención se refiere también a un método de ensayo para el estudio de la interacción de un compuesto y una proteína ABCG2 o ABCB11 determinando la actividad de dicha proteína ABCG2 o ABCB11, en el que dicho método de ensayo comprende las etapas de:

- 10
- proporcionar una proteína ABCG2 o ABCB11 activa a una célula de insecto o a una preparación de membranas de células de insectos,
 - poner en contacto un compuesto con la proteína ABCG2 o ABCB11,
 - medir cualquier actividad de la proteína ABCG2 o ABCB11 en presencia y en ausencia de dicho compuesto,
 - comparar los valores de la actividad obtenidos en presencia y en ausencia del compuesto,

15 *en donde*

la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos tiene un mayor nivel de colesterol en comparación con el nivel de colesterol fisiológico de las membranas de células de insectos.

20 La invención se refiere también a un método para analizar la interacción simultánea de al menos dos compuestos y una proteína ABCG2 o ABCB11 determinando la actividad de la proteína transportadora, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- proporcionar una proteína ABCG2 o ABCB11 activa a una célula de insecto o a una preparación de membranas de células de insectos,
- poner en contacto un primer compuesto con la proteína ABCG2 o ABCB11,
- medir una actividad de la proteína ABCG2 o ABCB11 en presencia y en ausencia de dicho primer compuesto,
- 25 - comparar los valores de la actividad obtenidos en presencia y en ausencia de dicho primer compuesto,
- poner en contacto un segundo compuesto con la proteína ABCG2 o ABCB11 en presencia del primer compuesto,
- medir la actividad de la proteína ABCG2 o ABCB11 en presencia del primer y del segundo compuesto simultáneamente,
- 30 - comparar los valores de la actividad obtenidos en presencia y en ausencia del segundo compuesto,
- evaluar el efecto del segundo compuesto sobre la actividad en presencia del primer compuesto,

en donde

la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos tiene un mayor nivel de colesterol en comparación con el nivel de colesterol fisiológico de una membrana de células de insectos.

35 En un método de ensayo preferido de la invención, se determina al menos una de las siguientes:

- la actividad de transporte de sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11, preferiblemente la actividad de ATPasa estimulada por sustrato de la ABCG2 o ABCB11, y/o el transporte vesicular de un sustrato por ABCG2 o ABCB11,
- la oclusión/atrapamiento de nucleótidos por ABCG2 o ABCB11,
- 40 - la actividad de ATPasa basal de ABCG2 o ABCB11.

En otro método de ensayo preferido de la invención se usa una preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos de acuerdo con la invención y/o se prepara la preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos de acuerdo con cualquiera de los métodos de preparación de la invención.

45 La invención se refiere también a un uso de colesterol para aumentar la actividad de una proteína ABCG2 o ABCB11

incrustada en una membrana de células de insectos en una preparación de células de insectos o en una preparación de membranas de células de insectos. Preferiblemente, la proteína ABCG2 o ABCB11 se analiza por: a) un ensayo de transporte vesicular y/o b) un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato. Preferiblemente, el colesterol se utiliza en forma de un complejo de colesterol y una ciclodextrina.

- 5 De acuerdo con una realización preferida, la ABC transportada aplicada en la presente invención es diferente de MDR1 (ABCB1).

De acuerdo con una realización preferida de la invención el transportador, preferiblemente ABCG2 o ABCB11, comprende una región de unión al colesterol. En una realización preferida, ABCG2 o ABCB11 útiles de acuerdo con la invención es capaz de interactuar con el colesterol en su región implicada en la catálisis y el transporte. En una realización preferida adicional, el colesterol aumenta la oclusión de nucleótidos con relación a la ABCG2 o ABCB11.

La invención proporciona también un sistema de ensayo útil para analizar si la proteína ABCG2 o ABCB11 puede ser activada por colesterol en una membrana de células de insectos. En esta realización de la invención cualquier ensayo o método de medición para detectar o determinar una actividad de ABCG2 o ABCB11, estando relacionada o correspondiendo dicha actividad a la actividad de transporte de sustrato de la proteína, es útil para decidir si la adición de colesterol ha aumentado la actividad de ABCG2 o ABCB11, y se puede aplicar. Preferiblemente, de acuerdo con este método de ensayo se proporciona ABCG2 o ABCB11 a una preparación de células de insectos o a una preparación de membranas de células de insectos cargada con colesterol y una preparación de control respectiva no cargada con colesterol, y se comparan los valores de actividad obtenidos para la preparación cargada con colesterol y para la preparación de control, y si el primero es mayor, con preferencia significativamente mayor, preferiblemente al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, muy preferiblemente al menos 5 veces mayor que el obtenido para la muestra de control, ABCG2 o ABC11 es útil en la presente invención.

Definiciones

Un derivado de colesterol tiene una estructura química que puede obtenerse por sustitución o adición del colesterol y conserva una o más de las siguientes características del colesterol: unión al dominio de unión del colesterol de ABCG2 o ABCB11, influencia sobre la fluidez de las membranas, acumulación en regiones de las membranas con mayores contenidos de colesterol que en su medio circundante (balsas o caveolas). Dichos derivados de colesterol son por ejemplo, 2,2-hidroxi-colesterol, 20,22-dihidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, variantes ceto y derivados con halógeno o pseudohalógeno, etc.

Los derivados de colesterol que usan una metodología de detección adecuada se pueden detectar o se pueden cuantificar con colesterol. Por ejemplo, el método aplicado puede ser cromatografía, donde el colesterol y el análogo de colesterol se eluyen parcial o completamente juntos; o un método espectroscópico en el que se solapan un componente característico del espectro del colesterol y del análogo de colesterol.

El contenido de colesterol de una membrana significa el contenido de colesterol detectable global o la cantidad reunida de colesterol y derivado de colesterol, medido el contenido de colesterol por cualquier método apropiado para detectar - preferentemente cuantitativamente - colesterol por el que se pueden determinar juntos el colesterol y todos los derivados de colesterol.

Cargar con colesterol significa aumentar el contenido de colesterol o el nivel de colesterol de una membrana, incluyendo el contenido o nivel de derivado de colesterol.

Una membrana o célula cargada con colesterol es una membrana o célula que ha sido sometida a carga de colesterol para aumentar su contenido de colesterol.

El contenido o nivel de colesterol fisiológico de una membrana celular - tal como membrana o preparaciones de membrana de células vivas significa el contenido de colesterol que se desarrolla en la membrana celular o en cualesquiera preparaciones de membranas procedentes de dichas células, sin carga ni agotamiento de colesterol inducido artificialmente, por ejemplo durante el cultivo celular - en un medio sin colesterol o sin complementar el colesterol, incluyendo, como anteriormente, análogos de colesterol y derivados de colesterol. Esta definición incluye también dominios de membranas. Por ejemplo, el contenido de colesterol fisiológico de las membranas de insectos, dependiendo del tipo de células, es alrededor de una décima parte en comparación con las membranas de células de mamíferos.

Una proteína transportadora ABCG2 o ABCB11 tiene "actividad de transporte de sustrato" cuando, en condiciones apropiadas, es capaz de transportar un sustrato de dicho transportador a través de la membrana biológica en la que está presente dicho transportador. Por lo tanto, la actividad de transporte de sustrato es una propiedad biológica inherente de la proteína transportadora ABC independientemente del hecho de si es posible medir o detectar dicha actividad. La actividad de transporte de sustrato de una proteína transportadora ABC puede ser detectada o medida típicamente por uno o más de los siguientes ensayos: ensayo de transporte celular o vesicular, en el que por lo general es posible mostrar directamente el transporte del sustrato, o ensayo de ATPasa estimulada por sustrato que es típicamente, si se ajustan adecuadamente las condiciones de ensayo, indicativo del transporte de sustrato. Más

frecuentemente se utilizan ensayos de ATPasa sensible al vanadato o sensible a un inhibidor. La sensibilidad al sustrato se refiere específicamente a la actividad medida por el ensayo de ATPasa estimulada por sustrato.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: El contenido de colesterol modula la actividad de ATPasa sensible al vanadato en preparaciones de membranas de ABCG2-Sf9 (a partir de células Sf9) y ABCG2-M (a partir de células de mamíferos; en ciertas figuras: MXR-M).

Fig. 1.A: Actividad de ATPasa sensible al vanadato de membranas de insectos que contienen ABCG2 activa [ABCG2-Sf9 (A)] en presencia de diferentes concentraciones de sustratos. Fig. 1.B: Actividad de ATPasa sensible al vanadato de membranas de células de mamífero que contienen ABCG2 activa [ABCG2-M (B)] en presencia de diferentes concentraciones de sustratos. Las preparaciones de membranas que contienen 20 µg de proteína de membrana se incubaron a 37°C durante 40 minutos con diferentes concentraciones de compuestos de ensayo y luego se determinó la actividad de ATPasa sensible al vanadato. Fig. 1.C: Se cargaron con colesterol membranas de ABCG2-Sf9 (▲) y ABCG2-M (■) por tratamiento con complejo *cholesterol@RAMEB*. Se determinó el contenido de colesterol en las membranas por el método de colesterol-oxidasa. Las concentraciones en el eje X representan la concentración total de colesterol en el medio de incubación. Fig. 1.D: El agotamiento de colesterol mediado por ciclodextrina de las membranas de ABCG2-Sf9 (▲) y ABCG2-M (■) se realizó por incubación de las membranas durante 30 minutos a 37°C en presencia de RAMEB a las concentraciones indicadas en la figura. Fig. 1.E y Fig. 1.F: Optimización de la carga de colesterol. Se monitorizaron las actividades basal (●) y estimulada con sulfasalazina (▲) después de completar el procedimiento de carga. Para optimizar el tiempo de incubación (E) se incubaron membranas de ABCG2-Sf9 en presencia de *cholesterol@RAMEB* (colesterol total 2 mM en el medio de incubación) durante los tiempos indicados en la figura. Para la optimización de la carga de colesterol (F) se incubaron membranas de ABCG2-Sf9 en presencia de diversas concentraciones de colesterol durante 1 hora. Los datos de actividad de ABCG2-ATPasa representan la media ± desviación típica (D.T.) de las mediciones por duplicado.

Fig. 2: Activación de membranas de Sf9 cargadas con colesterol que contienen ABCG2. Células ABCG2-Sf9 se cargaron con colesterol usando *cholesterol@RAMEB* (colesterol total 1 mM) durante 30 minutos a 37°C. El agotamiento de colesterol de las membranas de ABCG2-M se realizó a 37°C, durante 30 minutos, utilizando RAMEB 8 mM. - Fig. 2.A: Vesículas de membranas de Sf9 activadas por sulfasalazina. Curva superior: vesículas cargadas con colesterol; curva inferior: control no tratado. Fig. 2.B: Activación de vesículas procedentes de membranas de mamíferos por sulfasalazina. La curva inferior muestra la actividad residual de las células de mamífero después del agotamiento de colesterol por ciclodextrina. La curva superior muestra las células de control no tratadas.

Fig. 2.C, D, E, F: Para analizar la estimulación por sustrato, por topotecán y por prazosina, se determinó la activación de ABCG2-ATPasa de membranas de ABCG2-Sf9 cargadas con colesterol (▲) y de control (●) (C y E) así como de membranas de ABCG2-M agotadas de colesterol (▲) y de control (●) (D y F) por tratamiento (40 minutos, 37°C) con topotecán (C y D) y prazosina (E y F). Los datos representan la media ± D.T. de los triplicados.

Fig. 3: Dependencia de colesterol del transporte vesicular usando ABCG2 que contiene membranas de Sf9 – Fig. 3.A: Actividad de transporte después y antes de la carga de colesterol. Concentración de estrona-3-sulfato, 0,0465 µM, contenido de proteína 25 µg/pocillo, tiempo de incubación 1 minuto. (Sólo se utilizó estrona-3-sulfato marcado con tritio cuando se estableció el experimento, lo que explica la menor concentración en comparación con el experimento mostrado en la Fig. 5). Fig. 3.B: Aumento de la absorción de metotrexato por vesículas tratadas con colesterol (diseño experimental: metotrexato 100 µM; contenido de proteína 50 µg/pocillo; tiempo de incubación 12 minutos).

En la Fig. 3.C se muestra el contenido de colesterol de las vesículas utilizadas en los experimentos.

Fig. 4: Efecto de la carga de colesterol sobre la actividad de transporte vesicular de membranas de ABCG2-Sf9 que contenían ABCG2. Se midió la cantidad de compuestos radiomarcados retenida por las vesículas inversas a diferentes concentraciones de fármaco, como se indica en la figura.

Fig. 4.A: Actividad de transporte vesicular (absorción de metotrexato) en función de la concentración de metotrexato (curva de concentración de metotrexato, contenido de proteína 50 µg/pocillo, tiempo de incubación 12 minutos).

Fig. 4.B: La absorción de prazosina por las vesículas de membranas inversas cargadas con colesterol (▲) y de control (●) se realizó a 37°C durante 20 minutos. Los datos se calcularon como una diferencia entre la absorción vesicular medida en presencia y ausencia de ATP. Los datos representan la media ± D.T. de los duplicados.

Fig. 5: Estudio de la preparación de la membrana de ABCG2-Sf9 cargada con colesterol. Comparación del transporte vesicular de estrona-3-sulfato de membranas cargadas y no cargadas con colesterol (estrona-3-sulfato 1 µM, contenido de proteína 25 µg/pocillo, tiempo de incubación 1 minuto).

Fig. 6: Cambio de actividad de ATPasa sensible al vanadato de una preparación de membrana de Sf9 que contiene ABCG2 de tipo natural como resultado de preincubación durante 10 minutos con colesterol-ciclodextrina 1 mM. La actividad basal es la actividad medida sin sustratos. En presencia de Ko143, un inhibidor específico de ABCG2 casi no pudo detectarse ninguna actividad. Se aplicaron tres sustratos diferentes en las concentraciones dadas para

investigar el efecto del colesterol (EKI, ZD1839, prazosina).

Fig. 7: El efecto de diferentes sustratos e inhibidores de ABCG2 sobre la actividad de ATPasa de membranas de Sf9 preincubadas con colesterol (10 minutos, colesterol-ciclodextrina 1 mM) en función de la concentración.

Fig. 8: Actividad de ATPasa sensible al vanadato de preparaciones de membranas de Sf9 que contienen ABCG2 de tipo natural cuando la carga con colesterol se realiza durante la etapa de infección por baculovirus. 24 horas después de la infección se añadió al medio la cantidad dada de complejo *cholesterol@RAMEB* y se incubó a continuación durante 48 horas más. La figura representa los datos de las preparaciones de membranas que no se trataron ni se incubaron con colesterol-ciclodextrina a 3 concentraciones diferentes. Colesterol-ciclodextrina 1 mM provocó la disminución de la expresión del transportador. El contenido de colesterol más alto de la preparación de membranas no excedió 16 µg/mg de proteína. Se analizó el efecto de dos sustratos (EKI, prazosina) y un inhibidor específico (Ko143) a las concentraciones dadas.

Fig. 9: la Fig. 9.A muestra la actividad de ATPasa sensible al vanadato de preparación de membranas de Sf9 que contienen ABCG2 de tipo natural cuando la carga de colesterol se realiza durante el proceso de preparación de las membranas, después de homogeneización. La Fig. 9.B muestra el aumento del contenido de colesterol de las membranas en función de la concentración de colesterol-ciclodextrina. Se analizó el efecto de dos sustratos (EKI, prazosina) y un inhibidor específico (Ko143) a las concentraciones dadas.

Fig. 10: Efecto de la carga de colesterol o sitosterol sobre el transporte dependiente de ATP de MTX en vesículas de membranas de Sf9 inversas. La absorción de MTX se midió a concentración de MTX 100 µM durante 5 minutos a 37°C en vesículas de membranas que contenían el transportador ABCG2 humano de tipo natural o R482G-ABCG2 (G).

Columnas oscuras: transporte de MTX vesicular sin inhibidor, columnas rayadas: transporte de MTX en presencia del inhibidor específico de ABCG2, Ko143 (1 µM).

La parte 1 demuestra la absorción de MTX por las vesículas de control sin carga (que contienen 8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), la parte 2 muestra la absorción de MTX por las vesículas pre-tratadas con colesterol-ciclodextrina (C-CD) (que contienen 56 µg de colesterol/mg de proteína de membrana) y la parte 3 muestra la absorción de MTX por vesículas vacías tratadas previamente con ciclodextrina (CD) (que contienen 5 µg de colesterol/mg de proteína de membrana). La parte 4 muestra el efecto de la carga de sitosterol sobre la absorción de MTX dependiente de ATP por las vesículas de membranas de Sf9, cuando las vesículas se pre-trataron con sitosterol-beta-ciclodextrina (S-CD), de manera similar a los pre-tratamientos con CD o C-CD.

Se presentan los valores medios ± D.T. El asterisco indica diferencias significativas.

Fig. 11: Efecto de la carga de colesterol sobre la absorción de MTX y ESG dependiente de ATP por vesículas de membranas de Sf9.

La absorción de MTX y ESG se midió durante 5 minutos a 37°C a ATP 5 mM en vesículas de membranas que contenían el transportador ABCG2 humano de tipo natural, o R482G-ABCG2 (G). Durante este periodo de tiempo la absorción de los fármacos fue lineal. Se presentan los valores medios ± D.T.

Fig. 11.A: Dependencia de la concentración de MTX de la absorción de MTX. La absorción específica de ABCG2 para cada concentración de sustrato se calculó restando el valor obtenido en presencia del inhibidor de ABCG2 Ko143 1 µM.

■ – absorción de MTX por vesículas de control (8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural,

● – absorción de MTX por vesículas cargadas de colesterol (56 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural,

▲ – absorción de MTX por vesículas de control (8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador R482G ABCG2 (G) humano,

Δ – absorción de MTX por vesículas cargadas con colesterol (62 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador R482G ABCG2 (G) humano.

Fig. 11.B: Dependencia de la concentración de ESG de la absorción de ESG.

■ – absorción de ESG por vesículas de control (8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural,

□ – absorción de ESG por vesículas de control (8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural, en presencia de Ko143 1 µM,

● – absorción de ESG por vesículas cargadas con colesterol (56 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural,

○ – absorción de ESG por vesículas cargadas de colesterol (56 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), que contiene el transportador ABCG2 humano de tipo natural, en presencia de Ko143 1 µM.

5 Fig. 11.C: Estimulación relativa del transporte de MTX y ESG por carga de colesterol en vesículas de membranas de Sf9.

La absorción de MTX (●) se midió a una concentración de MTX 50 µM, mientras que el transporte de ESG (□) se midió a ESG 25 µM, durante 5 minutos a 37°C, en vesículas de membranas de Sf9 que contenían ABCG2 humana de tipo natural. Las membranas de la misma preparación celular, que contenían idéntica cantidad de ABCG2, se cargaron previamente por concentraciones variables de C-CD para contener diferentes niveles de colesterol. En la figura para cada punto de dato se presentan los valores medios ± D.T.

Fig. 12: Efecto de la carga del colesterol sobre la actividad de ATPasa de ABCG2 en preparaciones de membranas de Sf9 aisladas.

15 Fig. 12.A: Efecto de la carga de colesterol sobre la actividad de ATPasa sensible al vanadato en preparaciones de membranas de Sf9 aisladas. Se midió la actividad de ATPasa en las vesículas durante 20 minutos a 37°C en membranas que contenían ABCG2 humana de tipo natural, R482G-ABCG2 (R482G) o el transportador R482T-ABCG2 (R482T).

Se examinó la actividad de ATPasa basal y los efectos de dos sustratos potenciales del transportador ABCG2. La prazosina se aplicó a una concentración de 20 µM, se utilizó EKI a una concentración de 1 µM. El efecto de Ko143, un inhibidor específico de ABCG2, se midió a una concentración de 1 µM. Se presentaron los valores medios ± D.T. Las membranas de control contenían 8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana, mientras que las membranas cargadas con colesterol contenían 56 µg de colesterol/mg de proteína de membrana en el caso de ABCG2 de tipo natural, 62 µg de colesterol/mg de proteína de membrana en el caso de la ABCG2-R48G y 65 µg de colesterol/mg de proteína de membrana en el caso de la variante ABCG2-R482 T.

25 Columnas vacías: actividad de ATPasa basal, columnas en negro: EKI 1µM, columnas en gris claro: prazosina 20 µM, columnas rayadas: Ko143 1 µM.

Fig. 12.B and Fig. 12.C: Dependencia de la concentración del efecto estimulador de diferentes fármacos sobre la actividad de ATPasa de ABCG2 en preparaciones de membranas de células Sf9 de control (B) y cargadas con colesterol (C). La actividad de ATPasa se midió durante 20 minutos a 37°C en membranas que contenían ABCG2 humana de tipo natural, sin carga de colesterol (panel izquierdo) o cargadas con colesterol (panel derecho). La actividad de ATPasa específica de ABCG2 se determinó como la fracción de la actividad sensible al Ko143. La carga de colesterol por C-CD se consiguió como se describe en los métodos. Cada fármaco se analizó en al menos dos preparaciones de membranas independientes, los valores medios ± D.T. se presentan en un experimento representativo con mediciones por triplicado. Las membranas de control contenían 8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana, mientras que las vesículas de membranas cargadas con colesterol contenían 42 µg de colesterol/mg de proteína de membrana.

□ - Quercetina, ● - EKI-785, Δ - Iressa, ▼ - Prazosina, ◇ - Topotecán, □ Flavopiridol, X - SN-38

Fig. 13: Efecto de la carga de colesterol sobre la formación del compuesto intermedio catalítico (atrapamiento de nucleótidos) de ABCG2 humana en preparaciones de membranas de Sf9 aisladas.

40 Se midió el atrapamiento de 8-azido-nucleótidos por la proteína ABCG2 humana de tipo natural, expresada en membranas de células de Sf9, como se describe en el apartado Métodos, en presencia de Co-8-azido-ATP 2,5 µM (que contenía alfa-³²P-8-azido-ATP) a 37°C durante 2 minutos. Después de irradiación de UV, electroforesis en gel y electrotransferencia, las bandas marcadas se visualizaron por Phospho-Imager. La flecha indica la posición de la proteína ABCG2 identificada por inmunotransferencia.

45 Membranas de células Sf9 aisladas, que contenían la misma cantidad de proteína ABCG2 de tipo natural se cargaron con colesterol por pre-incubación con C-CD 4 mM, como se describe en los métodos. Las vesículas de membranas cargadas con colesterol contenían 50 µg de colesterol/mg de proteína de membrana, mientras que las membranas de control contenían 8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana. En el ensayo la concentración de EKI o Ko143 fue 1 µM y la concentración de prazosina fue 20 µM. La figura muestra un experimento representativo.

50 Fig. 14: Actividad de ATPasa basal sensible al vanadato de vesículas de membranas de insectos con Bsep (bomba exportadora de sales biliares) de ratón no tratadas y tratadas con colesterol.

Fig. 14.A: Efecto del taurocolato (□), glicocolato (■) y tauroquenodesoxicolato (▲) sobre la membrana con Bsep de ratón no tratada en el ensayo de ATPasa sensible al vanadato en vesículas de membranas cargadas con colesterol. La línea base está también indicada (■).

Fig. 14.B: Efecto del taurocolato ($\square$), glicocolato ($\blacksquare$) y tauroquenodesoxicolato ($\blacktriangle$) sobre la membrana con Bsep de ratón tratada en el ensayo de ATPasa sensible al vanadato. La línea base está también indicada ($\blacksquare$).

Fig. 15: Efecto de la carga de colesterol de vesículas de membranas inversas sobre la actividad de transporte vesicular de taurocolato (TC) de transportadores con Bsep humanos/de ratón/de rata; cargado con colesterol ($\blacksquare$), de control ($\square$).

Fig. 15.A: Efecto del colesterol sobre la actividad del transportador con Bsep de rata; cargado con colesterol ($\blacksquare$), de control ($\square$).

Fig. 15.B: Efecto del colesterol sobre la actividad del transportador con Bsep humano; cargado con colesterol ($\blacksquare$), de control ($\square$).

Fig. 15.C: Efecto del colesterol sobre la actividad del transportador con Bsep de ratón; de control ($\blacksquare$), cargado con colesterol ($\square$).

Descripción detallada de la invención

Muchos ensayos utilizados para estudiar los efectos de los transportadores de fármacos se basan en las membranas purificadas de células de insectos o algunas veces en las células de insectos propiamente dichas. Los sistemas virales útiles para infectar células de insectos son bien conocidos en la técnica. Sin embargo, se deben utilizar cualesquiera sistemas de expresión heterólogos, con una actitud prudente en cuanto a un medioambiente diferente del medioambiente natural de la proteína heteróloga que justifiquen estudios de correlación y validación. Sin embargo, pocos estudios abordan directamente este problema.

Cuando trataron de acercar los ensayos basados en células de insectos de proteínas transportadoras ABC a los ensayos basados en células de mamíferos y posiblemente reducir las diferencias recogidas en la técnica, los inventores plantearon la hipótesis de que la glicosilación alterada de vesículas de membranas de plasma humano y de insectos podría ser responsable de las diferencias observadas en el perfil de activación de dichos transportadores, tal como la falta de transporte de sustratos o el aumento de la actividad de ATPasa basal. Sin embargo, la desglucosilación de ABCG2 humana de tipo natural, expresada en membranas de ABCG2-M humanas no afectó a la actividad de ATPasa.

Otra diferencia puede residir en la diferente composición de las membranas. Por ejemplo, el contenido de colesterol de las membranas procedentes de células Sf9 es bajo, como se ha descrito anteriormente en la bibliografía [Gimpl. G et al., *Biochemistry* 34(42), 13794-801 (1995); Kopanchuk S és Ringen A, *Proc Estonian Acad Sci Chem*, 50(4), 229-240] y los inventores encontraron que contenían 20% del medido en las membranas de mamíferos.

La modulación con colesterol de MDR1 (ABCB1) está documentada en la bibliografía. Sin embargo, parece que los inventores fueron los primeros en sugerir que en dichos sistemas de ensayo basados en células de insectos (incluyendo vesículas de membranas) aumentando el contenido de colesterol de la membrana de células de insectos se puede llegar a obtener actividades transportadoras más similares a las obtenidas en células de mamíferos.

Por lo tanto, los inventores han examinado los efectos del colesterol en la membrana sobre la proteína MDR1 humana expresada en células intactas o en preparaciones de membranas de células Sf9 con varios ajustes experimentales y encontraron que en las condiciones utilizadas también en el presente estudio, era insignificante el efecto del nivel de colesterol en la membrana sobre estos transportadores. Más estrechamente, se encontró que la actividad basal de la MDR1-ATPasa aumentaba ligeramente, mientras que la actividad máxima de ATPasa estimulada por verapamilo, medida a verapamilo 50 μ M, no cambiaba prácticamente en membranas de Sf9 cargadas con colesterol.

De este modo, no obstante, los inventores crearon un sistema de ensayo fiable en el que en realidad puede ser analizada cualquier proteína transportadora ABC que se pueda expresar en células de insectos en forma activa en cuanto a si su actividad se puede aumentar por carga de colesterol (o análogo de colesterol) de la células de insectos o vesículas de membranas de células de insectos, dependiendo del formato del ensayo. En la presente memoria se entiende preferiblemente que la forma activa es capaz de transportar al menos un sustrato de dicho transportador ABC, incluso si este transporte no es detectable en sistemas o formatos de ensayo tradicionales de células de insectos o membranas de células de insectos.

Por lo tanto, a pesar del resultado negativo con el único transportador que hasta el momento se sabe que es sensible al colesterol, los inventores continuaron la experimentación y encontraron que las membranas de células de insectos de mayor nivel de colesterol proporcionan un mejor medioambiente para otros transportadores ABC, tales como ABCG2 y ABCB11.

La proteína ABCG2 es uno de los más importantes transportadores multifármacos implicados en la ADME de fármacos.

Estudios directos de transporte vesicular realizados en preparaciones de células de insectos indicaron que la velocidad de transporte máxima de ABCG2 se puede aumentar incluso hasta 20 veces aumentando los niveles de coleste-

rol de las membranas. Los inventores encontraron que utilizando diversos complejos de ciclodextrina y vesículas lipídicas, este efecto sobre ABCG2 era selectivo para alteraciones en el colesterol de las membranas. Resultados de los ensayos de ATPasa estimulada con sustrato confirmaron este hallazgo.

Se ha demostrado que la actividad de ATPasa de membranas sensible al vanadato o a un inhibidor en preparaciones de membranas de células que expresan el transportador ABC está correlacionada con la actividad de transporte de estas proteínas [B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs, A. Varadi, *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system*, *Physiol Rev* 86 (2006) 1179-1236].

Se encontró un comportamiento similar con ABCB11, como se muestra en esta memoria. ABCB11 (o BSEP, bomba exportadora de sales biliares) es el transportador principal de sales biliares del hígado. Se ha demostrado que la inhibición de BSEP puede perjudicar el transporte de ácidos biliares en la bilis y por lo tanto puede contribuir a la hepatotoxicidad inducida por fármacos.

Este efecto del colesterol de la membrana estaba ausente en el caso de la variante mutante R482G del transportador.

Basándose en estos descubrimientos y la enseñanza técnica proporcionada en esta memoria, motiva y permite a los expertos en la técnica analizar más transportadores ABC. Los expertos en la técnica decidirán fácilmente si otra proteína transportadora ABC dada analizada es una proteína transportadora que tiene una mayor actividad de transporte de sustrato en comparación con la actividad de transporte de sustrato de dicha proteína transportadora ABC si está presente en el mismo tipo de membrana de células de insectos que tiene un nivel de colesterol fisiológico, como se enseña en la presente memoria.

En la presente memoria se describen sistemas de ensayo para analizar transportadores ABC, tales como ensayos de transporte vesicular y ensayos de ATPasa estimulada por sustrato junto con métodos para la carga de colesterol. Muchos detalles técnicos preferidos de dichos ensayos son bien conocidos en la técnica [véase por ejemplo, aunque no exclusivamente, B. Sarkadi, E.M. Price, R.C. Boucher, U.A. Germann, G.A. Scarborough, *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*, *J Biol Chem* 267 (1992) 4854-4858; M. Muller, E. Bakos, E. Welker, A. Varadi, U.A. Germann, M.M. Gottesman, B.S. Morse, I.B. Roninson, B. Sarkadi, *Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein*, *J Biol Chem* 271 (1996) 1877-1883; C. Ozvegy, A. Varadi, B. Sarkadi, *Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation*, *J Biol Chem* 277 (2002) 47980-47990, que se incorporan como referencia en la presente invención].

En la descripción se proporcionan más indicaciones en cuanto al modo de acción del colesterol sobre los transportadores ABC. Aunque este mecanismo pertenece al ámbito teórico y por lo tanto no pretende limitar el alcance de la invención, los resultados analizados a continuación pueden ayudar a los expertos a encontrar más transportadores ABC que sean útiles en las preparaciones de células de insectos o las preparaciones de membranas de células de insectos de la invención.

En particular, la carga de colesterol afectó principalmente a la actividad enzimática con relativamente poco efecto sobre la afinidad a ABCG2. Por lo tanto, no se ven afectados los datos del transporte vesicular generados en el pasado utilizando membranas de plasma preparadas a partir de células de insectos con el objetivo de identificar sustratos de ABCG2, así como las especificidades de los sustratos, pero los datos anteriores de ABCG2-ATPasa obtenidos en sistemas de células de insectos pueden haber dado resultados negativos falsos especialmente para sustratos de alta afinidad. Esto apoya la idea de que las membranas de ABCG2-Sf9 cargadas con colesterol son los sistemas de ensayo de elección para estudiar las interacciones fármaco - ABCG2 con alto rendimiento.

Los inventores no han observado ningún signo de inhibición del transporte de ABCG2 ejercido por el colesterol en sus estudios, cuestionando la naturaleza del sustrato de colesterol. Alternativamente, el colesterol puede actuar como un regulador alostérico para la función de ABCG2. Se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo de potenciación mediado por el colesterol de la actividad de ABCG2-ATPasa y del transporte vesicular. Por otra parte, se encontró que la localización de membranas de ABCG2 no cambiaba en el curso de estos experimentos de modulación por colesterol.

También se ha estudiado la formación dependiente de vanadato de un nucleótido atrapado por ABCG2, que refleja el compuesto intermedio catalítico en los transportadores ABC en preparaciones de membranas de células Sf9 aisladas [C. Ozvegy, A. Varadi, B. Sarkadi, *Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation*, *J Biol Chem* 277 (2002) 47980-47990]. En los experimentos de los inventores, se encontró que en las membranas de células Sf9 enriquecidas en colesterol, los sustratos transportados produjeron un aumento de la velocidad de formación del compuesto intermedio catalítico también en ABCG2 de tipo natural. Este descubrimiento indica que el colesterol aumenta la velocidad de formación de un compuesto intermedio catalítico y mejora la renovación de ABCG2 dependiente del fármaco sustrato.

En este estudio los inventores observaron que el efecto del colesterol de la membrana era específico para la proteína ABCG2 de tipo natural que contiene una Arg (R) en la región de la membrana intracelular propuesta del tercer bucle transmembránico de la proteína. La sustitución de esta Arg por Gly o Thr altera significativamente la especificidad del sustrato de ABCG2 y parece que elimina su modulación por colesterol. Los presentes experimentos indican que estas variantes mutantes de ABCG2 pueden mostrar una actividad de transporte significativamente mayor sólo en las membranas de las células Sf9 con bajo contenido de colesterol y a mayores niveles de colesterol en la membrana la proteína de tipo natural pueden alcanzar una capacidad de transporte que se aproxima a la de las variantes mutantes.

Estos descubrimientos excluyen una estabilización o modulación no específica de esta proteína por el colesterol y sugieren que el colesterol puede interactuar con una región implicada en la región catalítica/de transporte de ABCG2. Por lo tanto, esta región puede tener un papel especial de esta región de la proteína tanto en el reconocimiento del sustrato como en la modulación de ABCG2 por colesterol.

Por lo tanto, en una realización de la invención se aconseja a los expertos en la técnica que busquen transportadores ABC que sean capaces de interactuar con el colesterol en su región implicada en la catálisis y el transporte. Además, se prefiere que el colesterol aumente la velocidad de renovación, es decir, aumente la actividad enzimática (opcionalmente descrita por V_{max}) con relativamente poco efecto sobre la afinidad del sustrato a ABCG2 (opcionalmente descrita por una pequeña variación en K_m).

Ejemplos

1. Métodos experimentales

A menos que se indique otra cosa, se aplicaron los siguientes métodos.

Productos químicos y bioquímicos: El [3 H]-metotrexato se compró a Moravsek Biochemicals (Brea, CA, USA). El [3 H]-estrona-3-sulfato y la [3 H]-prazosina se compraron a Perkin Elmer/NEN (Boston, MA, USA). El topotecán se compró a LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA). El anticuerpo contra ABCG2 se compró a Abcam (Cambridge, UK). La β -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RAMEB) y el complejo de colesterol de RAMEB [*cholesterol@RAMEB* (Piel et al., 2006), contenido de colesterol 4,74%] fue proporcionado por Cyclolab (Cyclodextrin Research & Development Laboratory) (Budapest, Hungary). Kol34 y Kol43 (Allen et al., 2002) fueron amables obsequios del Prof. GJ Koomen (National Cancer Institute, Amsterdam). Los otros reactivos se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a menos que en el texto se indique lo contrario.

Expresión de proteínas en células de insectos: Para la expresión de las células Sf9, se clonaron los cDNA de ABCG2 humano y sus variantes mutantes en vectores de transferencia de baculovirus recombinantes, las células de insectos se cultivaron en infectaron con los baculovirus como se ha descrito por [C. Ozvegy-Laczka, G. Koblos, B. Sarkadi, A. Varadi, *Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition*, Biochim Biophys Acta 1668 (2005) 53-63]. Se cosecharon células Sf9 infectadas con virus, se aislaron las membranas celulares, y se determinaron las concentraciones de las proteínas de membrana como se ha descrito previamente [C. Ozvegy, T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, B. Sarkadi, *Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed insect cells*", Biochem Biophys Res Commun 285 (2001) 111-117; C. Ozvegy-Laczka, G. Koblos, B. Sarkadi, A. Varadi, *Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition*", Biochim Biophys Acta 1668 (2005) 53-63; M. Muller, E. Bakos, E. Welker, A. Varadi, U.A. Germann, M.M. Gottesman, B.S. Morse, I.B. Roninson, B. Sarkadi, *Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein*", J Biol Chem 271 (1996) 1877-1883].

El nivel de expresión de ABCG2 se detectó por inmunotransferencia, usando el anticuerpo monoclonal BXP-21 y la técnica de quimioluminiscencia mejorada (ECL, Amersham Biosciences). La cuantificación de la expresión de ABCG2 se consiguió por densitometría de las manchas inmunotransferidas.

Desglicosilación de ABCG2: La desglicosilación enzimática se realizó usando péptido-N-glicosidasa F (Sigma, St. Louis, MO). Se añadió un μ L de la enzima en 500 unidades/mL a 50 μ L de suspensión de membranas (5 mg de proteína/mL) en TMEP (Tris 50 mM, manitol 50 mM, EGTA 2 mM, 8 μ g/mL de aprotinina, 10 μ g/mL de leupeptina, 50 μ g/mL de PMSF, DTT 2 mM, pH 7,0), se mezclaron vigorosamente y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. La desglicosilación se detectó por transferencia Western.

Carga con colesterol de las células Sf9: Se usó el complejo beta-metil-ciclodextrina - colesterol (*complejo cholesterol@RAMEB*) para cargar las células Sf9 con colesterol (Cyclolab Ltd. N° de catálogo: CY-9002.0). Es aplicable cualquier método conocido en la bibliografía para la carga de colesterol (véase por ejemplo Sheets et al., J. Cell Biol. 1999, 145(4):877-87). La metodología usualmente utilizada fue modificada de modo que el complejo *cholesterol@RAMEB* se añadió al medio dentro de las 24 horas de la infección por las células Sf9. En una variante preferida del método, por ejemplo, en mediciones de ABCB11, la metodología usualmente utilizada se modificó de modo que el colesterol-ciclodextrina se añadió a las células infectadas durante la preparación de la membrana, diluido en tampón HBSS.

Carga con colesterol de vesículas de Sf9: Se usó el complejo beta-metil-ciclodextrina - colesterol (*complejo cholesterol@RAMEB*) para cargar vesículas Sf9 con colesterol (Cyclolab Ltd N° de catálogo: CY-9002.0). El método estaba de acuerdo con las metodologías conocidas en la bibliografía para la carga de colesterol (Sheets et al., J. Cell Biol. 1999, 145(4):877-87). En resumen, las membranas se incubaron durante 30 minutos en presencia de *complejo cholesterol@RAMEB* por "placas filtrantes" o centrifugación. Dichas membranas tratadas se utilizaron para experimentos de transporte vesicular y de ATPasa. Una parte de la muestra y algunas vesículas no tratadas se reservaron para la determinación del contenido de colesterol usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

En una variante de este método, por ejemplo, utilizado cuando se compararon ABCG2 mutantes y de tipo natural, se prepararon membranas aisladas como se ha descrito antes, pero antes de la etapa de centrifugación final, se incubaron las membranas durante 20 minutos a 4°C con 2-4 mM de diversas preparaciones de ciclodextrina RAMEB (CD, C-CD o S-CD, obtenidas de Cyclolab). La ciclodextrina se eliminó en el curso de las siguientes centrifugaciones a alta velocidad. Las preparaciones de membrana se conservaron a -80°C en partes alícuotas y el contenido de colesterol se estimó por el kit rojo Amplex, descrito anteriormente.

En los siguientes experimentos se adoptó uno de los métodos de carga de colesterol descritos anteriormente.

Preparación de vesículas de membranas: Las vesículas de membranas se prepararon como se ha descrito anteriormente (Sarkadi et al., JBC, 1992, vol. 267, N° 7, pp 4854-8; Özvegy et al., BBRC, 2001, vol. 285, pp. 111-117).

Se obtuvieron preparaciones de vesículas de membranas humanas (ABCG2-M), así como preparaciones de vesículas de membranas obtenidas de células de insectos que expresaban ABCG2, (MXR-Sf9) de Solvo Biotechnology (Budapest, Hungary; <http://www.solvo.com/>). Ambas membranas sobre-expresaban la versión de tipo natural de ABCG2. Las preparaciones de vesículas de membranas de insectos se produjeron usando baculovirus recombinantes que codificaban ABCG2 (Ozvegy et al., 2002). Las células Sf9 se cultivaron e infectaron con reservas de baculovirus recombinantes como se ha descrito anteriormente (Sarkadi et al., 1992). Las vesículas de membranas purificadas a partir de células Sf9 infectadas con baculovirus se prepararon esencialmente como se ha descrito anteriormente (Sarkadi et al., 1992). El contenido de proteínas de membrana se determinó utilizando el método BCA (Pierce Biothecnology, Rockford, IL, USA).

Agotamiento del colesterol: Se realizó como se conoce en la bibliografía para la inhibición de la actividad de las enzimas ubicadas en balsas y/o caveolas y de las proteínas implicadas en las vías de transducción de señales (Keller and Simons J. Cell Biol. 1998, vol. 140, N° 6, pp. 1357-67; Lockwich et al., J. Biol. Chem. 2000, vol. 275, n° 16, pp. 11934-42; Vainio et al., EMBO Rep. 2002, vol. 391, Pt 3, pp. 95-100). Después del tratamiento, la ciclodextrina se separó como se ha descrito anteriormente por filtración ("placa filtrante") o centrifugación. Tanto para las membranas tratadas como no tratadas se midió la actividad de transporte de ATPasa y vesicular y se determinó el contenido de colesterol.

Determinación del contenido de colesterol: Las vesículas se pusieron en suspensión en una dilución que contenía Na-colato al 0,5%. El método se basa en la conversión enzimática de colesterol en el que se convierte en el derivado colest-4-en-3-ona por la colesterol-oxidasa, y después el residuo oxidado se analiza por HPLC. Esta conversión necesaria era esencial, puesto que son interferentes las señales de HPLC del colesterol natural y de la ciclodextrina.

Medición de la actividad del transportador: La actividad de ATPasa de los transportadores se mide basándose en su sensibilidad al vanadato como se conoce en la bibliografía (véase Noe et al., *Hepatology*, 2001, vol. 33, No. 5, pp. 1223-31; Schmitt et al., J. Neural. Transm., en prensa; Özvegy C et al., "Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells" Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jul. 06, 285 (1):111-7; Sarkadi, B. et al., (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; www.solvobiotech.com).

En el caso de ABCG2 se midió la actividad de ATPasa en presencia de diversos agentes de activación (sustratos) (sulfasalazina, topotecán, prazosina, mitoxantrona y metotrexato) de una manera dependiente de la concentración. Las muestras tratadas con ciclodextrina, o el complejo *cholesterol@RAMEB* se compararon con vesículas no tratadas.

En el caso de ABCB11 se midió la actividad de ATPasa en presencia de diversos agentes de activación (sustratos) (tauroquenosodexicolato, taurocolato, glicocolato) dependiendo de la concentración. Las muestras tratadas con el complejo *cholesterol@RAMEB* se compararon con vesículas no tratadas.

Expuesto brevemente, como un ejemplo, vesículas de membranas (20 µg/pocillo) se incubaron en tampón de ensayo de ATPasa (MgCl₂ 10 mM, MOPS-Tris 40 mM (pH 7,0), KCl 50 mM, ditiotreitól 5 mM, EGTA 0,1 mM, aziduro de sodio 4 mM, ouabaína 1 mM), ATP 5 mM y diversas concentraciones de fármacos de ensayo durante 40 minutos a 37°C. Las actividades de ATPasa se determinaron como la diferencia de la liberación de fosfato inorgánico medida con y sin presencia de ortovanadato de sodio 1,2 mM (actividad de ATPasa sensible al vanadato). En otros experimentos, cuando se ensayó la combinación de dos sustratos y/o un sustrato y un inhibidor, se utilizó el kit PREDEASY ABCG2-ATPase (kit SB-MXR-HAM-PREDEASY-ATPase; Solvo Biotechnology, Szeged, Hungary) para la deter-

minación de la actividad de ABCG2-ATPasa de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

Medición de la actividad de transporte vesicular: Las mediciones de la actividad de transporte se llevaron a cabo con vesículas de membranas purificadas que contenían ABCG2 o ABCB11 aisladas de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) infectadas con baculovirus o células de mamíferos (ABCG2-M). Las preparaciones de membranas contenían 5-16% de vesículas de membranas, orientadas inversamente y cerradas. El transportador bombea las moléculas en el interior de estas vesículas. Las vesículas se pueden separar filtrando rápidamente la suspensión de membranas por un filtro de vidrio o por una membrana de nitrocelulosa (usando vacío).

La determinación cuantitativa de la molécula transportada se puede hacer de varias maneras, como: HPLC, LC/MS, pero también es adecuado etiquetado fluorescente o radiactivo. Se utilizaron sustratos marcados con tritio en los ensayos y el modo de detección fue centelleo de líquidos.

Medición de la actividad de transporte vesicular en el caso de ABCG2: Más precisamente, como ejemplos, se incubaron vesículas de membranas inversas en presencia o ausencia de ATP 4 mM. Para el transporte vesicular de metotrexato las mediciones se llevaron a cabo en MgCl₂ 7,5 mM, MOPS-Tris 40 mM (pH 7,0), KCl 70 mM a 37°C durante 12 minutos. El transporte se detuvo por adición de tampón de lavado frío (MOPS-Tris 40 mM (pH 7,0), KCl 70 mM).

Para el transporte vesicular de prazosina se incubó en tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, (pH 7,4); sacarosa 250 mM y MgCl₂ 10 mM a 37° C durante 20 minutos. El transporte se detuvo por adición de tampón de lavado frío (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; sacarosa 250 mM y NaCl 100 mM).

Para el transporte vesicular de estrona-3-sulfato se incubó en tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, (pH 7,4), sacarosa 250 mM, y MgCl₂ 10 mM a 32°C durante 1 minuto. El transporte se detuvo por adición de tampón de lavado frío (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; sacarosa 250 mM y NaCl 100 mM).

A continuación, la mezcla de incubación se filtró rápidamente por filtros de fibra de vidrio de la clase B (tamaño de poros, 0,1 µm). Los filtros se lavaron con 5x200 µL de tampón de lavado enfriado con hielo y la radioactividad retenida en el filtro se midió por recuento de centelleo de líquidos. El transporte dependiente de ATP se calculó restando los valores obtenidos en ausencia de ATP de los obtenidos en presencia de ATP.

Diseño del ensayo ilustrativo y principales etapas para ABCG2

- Preparar una concentración apropiada de suspensión de membranas en tampón de ensayo; añadir a la suspensión los sustratos no marcados y marcados con ³H. Distribuir la suspensión en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Sustratos:

- o ³H-estrona-3-sulfato (Perkin Elmer, NET-203/9,25 MBq)
- o ³H-Metotrexato (Moravek, MT701)
- o estrona-3-sulfato (Sigma, E0251)
- o metotrexato

- Preincubar a temperatura de incubación; iniciar el ensayo por adición de MgATP
- Incubar, detener la reacción por adición de tampón de lavado en frío (4°C)
- Filtrar en placas de filtración (Millipore: MSFBN6B 10) y lavar con tampón de lavado
- Colocar una cantidad conocida de gotas de suspensión de membrana sobre un filtro vacío para determinar el recuento total por minuto (cpm)
- Secar la placa de filtración
- Añadir el cóctel de centelleo al pocillo que se ha de medir
- Medir con un analizador de centelleo de líquidos
- Calcular la velocidad de transporte del cpm obtenido.

Medición de la actividad de transporte vesicular en caso de ABCB11: Las mediciones de la actividad de transporte se llevaron a cabo con vesículas de membranas purificadas que contenían el transportador ABCB11 humano, de rata o de ratón (BSEP, sPgp) aislado de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) infectadas con baculovirus. Las preparaciones de membranas contenían 5-16% de vesículas de membranas orientadas inversamente cerradas. El trans-

portador bombea las moléculas al interior de estas vesículas. Las vesículas se pueden separar por filtración rápida de la suspensión de membranas por un filtro de vidrio o por una membrana de nitrocelulosa (usando vacío).

La determinación cuantitativa de la molécula transportada se puede realizar de varias maneras, como: HPLC, LC/MS, pero también es adecuado marcado fluorescente o radiactivo. En los ensayos se usaron sustratos marcados con tritio y el modo de detección fue centelleo de líquidos.

Diseño del ensayo y principales etapas para ABCB11

Preparar una concentración apropiada de suspensión de membranas en tampón de ensayo; añadir a la suspensión los sustratos no marcados y marcado con ^3H . Distribuir la suspensión en placas de microtitulación de 96 pocillos. Sustratos:

Ácido ^3H -taurocólico (PerkinElmer, NET-322/9,25 MBq)

Ácido taurocólico (Sigma, T0750)

Preincubar a la temperatura de incubación; iniciar el ensayo por adición de MgATP
Incubar, detener la reacción por adición de tampón de lavado en frío (4°C)

Filtrar en placas filtrantes (Millipore: MSFBN6B10) y lavar con tampón de lavado

Colocar una cantidad conocida de gotas de suspensión de membrana sobre un filtro vacío para determinar el recuento total por minuto (cpm)

Secar la placa filtrante

Añadir el cóctel de centelleo a los pocillo que se han de medir

Medir con un analizador de centelleo de líquidos

Calcular la velocidad de transporte del cpm obtenido.

Determinación del contenido de colesterol: El contenido de colesterol de las membranas se determinó usando el método de colesterol-oxidasa (Contreras et al., 1992). Se mezclaron 10 μL de mezcla de reacción (MgCl_2 500 mM, tampón Tris 500 mM, DTT 10 mM, 100 mg de Triton X-100, pH 7.4) con 10 μL la enzima colesterol-oxidasa a 1 mg/mL (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) y 50 μL de membranas. La solución se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de 100 μL de una solución de metanol/etanol (50% (v/v)) y se incubó a 0°C durante 30 minutos adicionales. Después de una centrifugación de 5 minutos a 700 g, se analizaron por HPLC 25 μL del líquido sobrenadante. Para la separación cromatográfica se usaron un aparato de HPLC (1100 Series set, Agilent, Santa Clara, CA, USA) y una columna cromatográfica C18 de fase inversa (3 μM , 100*2 mm Luna, Phenomenex, Torrance CA, USA). Los analitos se separaron usando ácido acético/metanol al 1 % (v/v) como fase móvil a un caudal de 0,3 mL/min. El colesterol oxidado se detectó usando un detector de UV a 241 nm. Para cuantificar la cantidad de colesterol se usaron patrones externos de calibración de colesterol.

Análisis de los datos: Las potencias de los fármacos para alterar la actividad de ATPasa se obtuvieron a partir de los gráficos de la velocidad de hidrólisis de ATP en función del logaritmo de la concentración de fármaco por regresión no lineal de la ecuación general de dosis-respuesta sigmoide:

$$v = V_{\min} + \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + 10^{(\log \text{CE}_{50} - [\text{A}]) \cdot \text{Hill slope}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde v = respuesta (nmol Pi/min/mg), $V_{\min}$ = respuesta mínima, $V_{\max}$ = respuesta máxima, $CE50$ = concentración de ligando que produce 50% de respuesta máxima (eficacia), $[A]$ = concentración real de fármaco de ensayo y Hill-slope = pendiente de Hill es un parámetro que caracteriza el grado de cooperatividad. La $CE50$ se define de acuerdo con *The International Union of Pharmacology Committee* (Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T. and Christopoulos, A. (2003) *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*. XXXVIII. *Update on terms and symbols in quantitative pharmacology*. *Pharmacol Rev* 55: 597-606).

Los transportadores tienen frecuentemente para el mismo fármaco sitios de unión de inhibidores de al menos una baja y una alta afinidad. Por tanto, se obtuvieron frecuentemente curvas de respuestas de forma de campana. Para estos tipos de curvas se usó una ecuación que es una combinación de dos respuestas sigmoideas:

$$v = Dip + \frac{V_{\min 1} - Dip}{1 + 10^{(\log CE50_1 - \log [A]) \cdot Hillslope_1}} + \frac{V_{\min 2} - Dip}{1 + 10^{(\log CE50_2 - \log [A]) \cdot Hillslope_2}} \quad (Ec. 2)$$

donde v = respuesta (nmol Pi/min/mg), $V_{\min 1}$ y $V_{\min 2}$ = respuestas mínimas, Dip = respuesta máxima, $CE50_1$ y $CE50_2$ = concentraciones de ligando que producen 50% de respuesta máxima (eficacia), $[A]$ = concentración real del fármaco de ensayo y $Hillslope_1$ y $Hillslope_2$ son las constantes de cooperatividad.

Los parámetros de Michaelis-Menten de la velocidad máxima ($V_{\max}$) y de la afinidad del fármaco (K_m) se obtuvieron a partir de gráficos de la actividad de la ATPasa en función de la concentración del fármaco de ensayo por regresión no lineal de la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (Ec. 3)$$

donde v = actividad enzimática (nmol Pi/min/mg), $V_{\max}$ = actividad máxima de ATPasa (nmol Pi/min/mg), K_m = constante de Michaelis-Menten para el sustrato ensayado (nM) y $[S]$ concentración de sustrato (nM). La ecuación 3 se usó también para ajustar la curva en los gráficos de transporte vesicular.

Como ejemplo, para ajustar la curva, se puede usar el programa informático PRISM 3.0 (Graphpad) para los cálculos de $V_{\max}$ y la pendiente K_m .

2. Experimentos para comparar membranas de insectos y membranas humanas

2.1 Ensayos de comparación de ABCG2-ATPasa en membranas de células Sf9 y humanas, en presencia y ausencia de sustratos con optimización de parámetros.

Los siguientes resultados se obtuvieron cuando se compararon las preparaciones de membranas de células Sf9 con las preparaciones de membranas humanas. Ambas membranas presentaban valores de K_m similares para la actividad de ATPasa basal sensible al vanadato con respecto a ATP (2,0 mM y 2,2 mM respectivamente para membranas de ABCG2-Sf9 y ABCG2-M), así como para el transporte de [3 H]-metotrexato vesicular dependiente de ATP con respecto al metotrexato (3,9 mM y 3,6 mM). En ambos casos el transporte pudo ser inhibido por el inhibidor selectivo de ABCG2, Ko143 1 μ M.

Sin embargo, además de las similitudes se observaron diferencias significativas. Los sustratos de ABCG2 como sulfasalazina, topotecán y prazosina solo influyeron ligeramente sobre la actividad de ATPasa de las membranas de Sf9 (la sulfasalazina era un activador débil, mientras que el topotecán y la prazosina eran inhibidores débiles; véase la Fig.1.A), mientras que los tres compuestos estimularon significativamente la actividad de ATPasa de las membranas humanas (Fig.1B). Por tanto, las preparaciones de membranas de Sf9 no eran adecuadas para analizar estos sustratos..

Se ha encontrado ahora que las composiciones lipídicas de membranas de insectos y de mamíferos difieren significativamente, incluyendo el contenido de colesterol [Gimpl, G., Klein, U., Reilander, H. and Fahrenholz, F. (1995) "Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex". *Biochemistry* 34: 13794-13801]. Los inventores encontraron que los contenidos de colesterol de las vesículas de ABCG2-Sf9 y ABCG2-M que contenían la proteína ABCG2 eran marcadamente diferentes, exhibiendo ABCG2-Sf9 un nivel de colesterol aproximadamente 4-5 veces menor (6,5 μ g/mg de proteína frente a 28,99 μ g/mg de proteína (Fig. 1C) y 6,26 frente a 23,68 (Fig. 1D)). La carga de colesterol de ambas membranas usando tratamiento con *cholesterol@RAMEB* dio como resultado un aumento de aproximadamente quince veces el contenido de colesterol en las vesículas de ABCG2-Sf9 y un aumento de tres veces en las vesículas de ABCG2-M produciendo un contenido de colesterol final de $\approx$ 90 μ g/mg de proteína final en ambas membranas (Fig. 1C). Por otro lado, el tratamiento con RAMEB eliminó el colesterol de ambas membranas muy eficazmente (Fig. 1D).

Para posteriores experimentos se optimizó la carga de colesterol de membranas de Sf9 que expresaban ABCG2

para la actividad de ATPasa con respecto al tiempo de exposición (Fig. 1E) y la concentración de carga de colesterol (Fig. 1F). Para los experimentos mostrados en las Fig. 2 y la Fig. 4 se eligieron como tiempo y concentración óptimos 30 minutos y *cholesterol@RAMEB* 1 mM. El contenido de colesterol en las membranas después del tratamiento fue aproximadamente 60 µg/mg de proteína, aproximadamente 2 veces mayor que en la membrana de ABCG2-M. Los inventores seleccionaron estos valores porque en estas condiciones el contenido de colesterol de las membranas era relativamente insensible a cualquier parámetro (Fig. 1E y F), por tanto se permitió una producción reproducible de membranas cargadas con colesterol.

Para el agotamiento del colesterol de las membranas de ABCG2-M se seleccionó un tratamiento de 30 minutos usando RAMEB 8 mM lo que proporcionó preparaciones de membranas con un contenido medio de colesterol de 3,5 µg/mg de proteína.

2.2 Comparación de la actividad de ATPasa de las células de insectos y de mamíferos en presencia de sulfasalazina después de carga o agotamiento de colesterol

La actividad de ATPasa de ABCG2 (MXR) sensible al vanadato de vesículas de Sf9 no tratadas aumentó desde 20 nmol/Pi/mg prot/min (Fig. 2. panel A, curva inferior) en 5 nmol/Pi/mg prot/min en presencia de sulfasalazina. Después de la carga de colesterol, la actividad basal aumentó hasta casi 35 nmol/Pi/mg prot/min (Fig. 2 panel A, curva superior) que podía ser activada adicionalmente hasta 58 nmol/Pi/mg prot/min (!) por sulfasalazina.

La actividad basal de vesículas preparadas a partir de células de mamíferos es inferior a 25 nmol/Pi/mg prot/min que podía ser aumentada hasta 40 nmol/Pi/mg prot/min por sulfasalazina, mientras que el agotamiento del colesterol de las células redujo significativamente ambas actividades (Fig 2 panel B, curva superior). Por consiguiente, tanto la actividad basal como la actividad más alta medida en presencia de sulfasalazina aumentó en las células no tratadas, pero todavía era significativamente inferior comparada con las actividades obtenidas con membranas de Sf9 cargadas con colesterol.

Similarmente, tanto el topotecán como la prazosina estimularon significativamente la ABCG2-ATPasa en membranas ABCG2-Sf9 (Fig. 2.C y E) y membranas ABCG2-M (Fig. 2.D y F) cargadas con colesterol, mientras que las membranas ABCG2-Sf9 no tratadas (Fig. 2C y E) y las membranas ABCG2-M agotadas en colesterol (Fig. 2D y F) no eran sensibles. Los datos cinéticos de la ABCG2-ATPasa se resumen en la Tabla 1. Los datos muestran una buena correlación entre los valores V_{max} obtenidos con las membranas ABCG2-Sf9 y las membranas ABCG2-M cargadas con colesterol. Sin embargo, los valores K_m observados para los sustratos fueron aproximadamente 1,5 - 3,0 veces mayores que con las membranas ABCG2-Sf9 cargadas con colesterol.

Tabla 1

Comparación de la cinética de ABCG2-ATPasa de sulfasalazina, estrona-3-sulfato y topotecán obtenida en membranas de ABCG2-Sf9 cargadas con colesterol y ABCG2-M de tipo natural.

Fármaco de ensayo	ABCG2-Sf9 cargada con colesterol		ABCG2-M	
	V_{max}^*	K_m^{**}	V_{max}^*	K_m^{**}
Sulfasalazina	26,30	2,46	21,18	0,76
Estrona-3-sulfato	35,58	26,42	38,87	15,12
Topotecán	5,64	18,06	5,83	8,54

*nmol Pi/mg prot./min

**µM

Aunque hay una variación entre las diferentes preparaciones de membranas, sin embargo dentro de cada preparación de membrana dada siempre se observó en cada caso una dependencia significativa del colesterol.

3. Efecto de la carga de colesterol sobre la actividad del transporte vesicular

Con ayuda de la tecnología de radioisótopos se puede mostrar que el aumento de la actividad de ATPasa está correlacionado con el transporte real de moléculas de sustrato. Similarmente a los ensayos de ATPasa se usaron vesículas de membranas "inversas", y los ensayos se caracterizaron por la absorción dependiente de ATP de los sustratos marcados. Similarmente a los ensayos de ATPasa, la actividad de transporte está correlacionada con el contenido de colesterol de las vesículas (Fig. 3) cuando se usó como sustrato E3S (estrón-3-sulfato, Fig 3.A) o

do de colesterol de las vesículas (Fig. 3) cuando se usó como sustrato E3S (estrona-3-sulfato, Fig 3.A) o metotrexato (Fig 3.B). Como se observa con las mediciones de la actividad de ATPasa, el colesterol aumenta la actividad de transporte de las vesículas preparadas a partir de células Sf9 más que para las que se originan de membranas de mamíferos. En la Fig 3C se muestra el contenido de colesterol de las vesículas usadas en la los experimentos.

- 5 La dependencia de la concentración de sustrato del transporte vesicular se investigó con metotrexato como se muestra en la Fig. 4. Los datos se calcularon sobre la hipótesis de que era aplicable la cinética de Michaelis-Menten. Como se ve en la Tabla 2, mientras que aumenta la $V_{\max}$ en seis veces, los valores de K_m sólo cambian ligeramente.

Tabla 2

10 Efecto de la carga de colesterol sobre células ABCG2-Sf9; la actividad del transporte vesicular se midió frente a la concentración de metotrexato y se calcularon los parámetros cinéticos como se ha descrito en la parte experimental.

	Membranas no tratadas	Membranas tratadas con colesterol
	±D.T.	± D.T.
$V_{\max}$	367,2 ±21,91	2144 ±29,92
K_m	935,2 ±142,2	1068 ±36,46

En la Fig. 5 se compara el transporte de estrona-3-sulfato por membranas de Sf9 tratadas con colesterol y no tratadas Fig 5. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del ensayo vesicular estándar con E3S usado por Solvo como se detalla en el Ejemplo 1.

15 **4. Medición de la actividad de ATPasa con membranas que están cargadas diferentemente con colesterol por diferentes métodos**

En los ensayos de ATPasa, independientemente de la tecnología usada para la carga de colesterol, todas las de preparaciones de membranas de Sf9 que expresan ABCG2 de tipo natural presentaron cambios de actividad dependiente del sustrato significativamente mayores (en algunos casos 100%) en comparación con los de las vesículas de control. Los efectos de los sustratos usados en el estudio ya han sido mostrados previamente con las preparaciones de membranas de origen mamífero, sin embargo, en el caso de células Sf9 los sustratos indujeron efectos solo despreciables, si los indujeron. Por consiguiente de acuerdo con el presente conocimiento el tratamiento con colesterol no modifica la especificidad del sustrato. Para optimizar el sistema, la carga de colesterol de las membranas de Sf9 se ha realizado por tres vías:

25 a) *Carga del colesterol directamente antes del ensayo de ATPasa.* Las vesículas de membranas aisladas se incubaron en colesterol-ciclodextrina 1 mM durante 10 minutos a 37°C (98,6°F), seguido por la retirada por centrifugación de los complejos *cholesterol@RAMEB* no unidos y luego se llevó a cabo el ensayo de ATPasa (Fig. 5 y 7, Tabla 3 más adelante).

30 b) *Carga de células vivas con colesterol.* 24 horas después de la infección de Sf9 con el baculovirus se añadió al medio el complejo *cholesterol@RAMEB* a una concentración dada y se cultivó durante 48 horas adicionales. La membrana se preparó a partir de células tratadas (Fig. 8).

35 c) *Carga del colesterol durante la preparación de la membrana.* Después de la homogeneización y antes de la ultracentrifugación se llevó a cabo la etapa de carga de colesterol y la preparación se trató con colesterol-ciclodextrina 0,5-2 mM durante 20 minutos a +4°C (39,2°F). Este método demostró ser el más eficaz, con la carga más alta de colesterol de las membranas, mientras que el tamaño y la calidad de las vesículas permanecieron inalterados (Fig 9).

El resultado de cada tipo de carga de colesterol se describe brevemente más adelante.

Método a)

40 El efecto de la pre-incubación con colesterol sobre preparaciones de membranas de Sf9 que contenían ABCG2 de tipo natural se muestra en la Fig. 6. La relativamente alta actividad de ATPasa basal de las preparaciones de membranas de Sf9 aumenta como resultado del tratamiento con colesterol. En presencia de Ko143, un inhibidor específico de ABCG2, el efecto es despreciable y no es modificado por el colesterol. Para los tres sustratos (EKI, ZD 1839, prazosina) investigados el tratamiento con colesterol causó un aumento muy significativo de la actividad de ATPasa, en contraste con las membranas de control en donde el efecto fue insignificante.

45 La Tabla siguiente resume el efecto de los sustratos de ABCG2 investigados que fueron eficaces en ensayos de

ATPasa con membranas tratadas ABCG2 de tipo natural tratadas con colesterol (de acuerdo con el apartado a). No se observó ningún efecto para los sustratos marcados** cuando la preparación de membranas no se trató con colesterol. El verapamilo, la mitoxantrona y la rodamina no presentaron ningún efecto incluso con membranas tratadas con colesterol en cualquier ensayo de ATPasa.

5 **Tabla 3**

Compuesto	Concentración	Nivel de estimulación (actividad de ATPasa sensible al vanadato en % (el número de experimentos independientes se da entre paréntesis)).
EKI 785	1 μ M	100 $\pm$ 15 (7)
ZD 1839	5 μ M	73 $\pm$ 19 (3)
Prazosina*	20 μ M	79 $\pm$ 12 (2)
Doxorubicina**	50 μ M	83 $\pm$ 18 (3)
Sulfasalazina	20 μ M	71% (3)
Topotecán	200 μ M	31% (3) (no se puede activar sin carga de colesterol)
	Concentración	Nivel de inhibición (actividad de ATPasa sensible al vanadato en % (número de experimentos))
STI	1 μ M	26 $\pm$ 4 (2)
FTC	7 μ M*	45 (1)
Ko143	1 μ M	85 $\pm$ 7 (5)

La Fig 7 ilustra los efectos estimulantes e inhibidores dependientes de la concentración de ciertos sustratos de ABCG2 importantes y los inhibidores presentados en la actividad de ATPasa de membranas de Sf9 preincubadas con colesterol. Los resultados confirman que las concentraciones eficaces de activadores e inhibidores son similares a las aplicadas a membranas de mamíferos.

Método b)

La carga de colesterol de las células vivas durante la Infección por baculovirus de células Sf9 en comparación con el método de pre-incubación dio como resultado un efecto menor, pero aún detectable. Sin embargo, el uso de este método está limitado por el hecho de que la expresión del transportador disminuye ya a complejo *cholesterol@RAMEB* 1 mM la expresión del transportador, por otra parte, por encima de esta concentración el complejo tiene efectos tóxicos. El contenido de colesterol es mucho menor en las vesículas finales que si se aplica el método c). La Fig. 8. Muestra el resultado de un experimento representativo.

Método c)

La Fig. 9 muestra la eficacia de la carga de colesterol cuando se ejecuta durante el proceso de preparación de membranas de acuerdo con el método c). Se obtuvieron resultados similares con otras preparaciones independientes. Las actividades basales para concentraciones de carga dadas no cambian, sin embargo, mientras que el efecto máximo de los sustratos está en el intervalo similar al de las vesículas cargadas de acuerdo con el método a). De acuerdo con los presentes resultados utilizar colesterol-ciclodextrina 2 mM para la carga de colesterol es preferido en esta realización de carga de colesterol de la invención. En una variante altamente preferida de esta realización de la Invención, la preparación de membranas se incubó en un medio HBBS (pH 7,4) que contenía complejo *cholesterol@RAMEB* 0,55 mM durante 30 minutos, a 37°C (98,6°F).

Se debe advertir, cuando EKI es el sustrato, que la actividad de ATPasa sensible a vanadato, en presencia del sustrato, es mayor incluso a bajas concentraciones de ATP (0,2-0,4 mM) para membranas cargadas con colesterol.

5. Efecto de comparación de la carga de colesterol sobre las mutantes de ABCG2

En este conjunto de experimentos se llevó a cabo una comparación sistemática de ABCG2 de tipo natural y sus mutantes.

5.1. Experimentos con membranas de células Sf9 aisladas

Con el fin de explorar los detalles moleculares de los efectos del colesterol observados en células intactas, se expresaron en células Sf9, ABCG2 y sus variantes mutantes R482G, R482T. Estas células se manipularon por ingeniería genética para expresar grandes cantidades de las variantes de ABCG2 humanas, a niveles aproximadamente iguales de proteína transportadora [Ozvegy-Laczka et al., "Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition", *Biochim Biophys Acta* 1668 (2005) 53-63]. Por otra parte, en las membranas aisladas de células Sf9 se pudo examinar el transporte vesicular directo, la actividad de ATPasa estimulada por fármacos y la formación de compuestos intermedios catalíticos (atrapamiento de nucleótidos) [Ozvegy et al., "Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation", *J Biol Chem* 277 (2002) 47980-47990]. Los inventores también estudiaron en el mismo sistema los efectos del colesterol sobre la proteína MDR1 humana, expresada como se ha descrito antes [Sarkadi et al. *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*, *J Biol Chem* 267 (1992) 4854-4858].

Para la carga con colesterol de membranas de células Sf9, que contenían niveles relativamente bajos de colesterol endógeno, los inventores aplicaron una corta preincubación de las membranas a 4°C con colesterol-beta-ciclodextrina (C-CD, *cholesterol@RAMEB*), seguido por una eliminación de este agente durante las etapas de centrifugación posteriores. El contenido de colesterol de la membrana original en nuestras preparaciones de membranas de células Sf9 estaba entre 5-8 µg/mg de proteína de membrana, y con preincubación con C-CD 1-5 mM este contenido de colesterol podía ser aumentado gradualmente hasta 60-80 µg de colesterol/mg de proteína de membrana.

Estudios de transporte vesicular: En estos experimentos los inventores realizaron mediciones directas de transporte de sustrato dependiente de ATP usando vesículas de membranas inversas aisladas de células Sf9 que expresaban ABCG2.

La Fig. 10 demuestra el efecto de la carga de colesterol de la membrana sobre la actividad de transporte de metotrexato (MTX) de la proteína ABCG2 humana en estas vesículas de membranas. La carga de las membranas con colesterol (C-CD) aumentó en gran medida la actividad de transporte de la ABCG2 de tipo natural, produciendo un aumento de 15-20 veces cuando el colesterol inicial de la membrana fue elevado hasta 65 µg de colesterol/mg de proteína de membrana. Los inventores encontraron un gran aumento similar, en la absorción dependiente de ABCG2, de beta-estradiol-17-glucurónido (ESG - véase más adelante) y de estrona-3-sulfato (E3S - no mostrado) en las vesículas de membranas de Sf9 después de la carga de colesterol. Los inventores encontraron que el pretratamiento con ciclodextrina libre (CD) no afectó significativamente a la actividad de transporte de MTX (véase la Fig. 10), ESG o E3G de la proteína ABCG2 humana. Además, cuando los inventores aplicaron CD cargada con sitosterol (S) (Fig. 10 - parte 4), o vesículas de fosfatidilcolina en una preincubación (no mostrada), no encontraron ningún efecto sobre la actividad de transporte dependiente de ABCG2. Ko143, un inhibidor específico de ABCG2, abolió el transporte de sustrato tanto en las vesículas de membranas de control como en las cargadas con colesterol.

Las variantes R482G o R482T de ABCG2 tienen propiedades de manipulación de sustrato significativamente diferentes a las de la proteína de tipo natural. Estas variantes mutantes transportan ciertos compuestos cargados negativamente, por ejemplo, MTX, ESG o E3S sólo con una actividad muy baja. Como se muestra en la Fig. 10, el transporte de MTX por la variante ABCG2-R482G fue muy bajo tanto en las vesículas de las membranas Sf9 de control como en las cargadas con colesterol. Del mismo modo, la velocidad de transporte de MTX por la variante ABCG2-R482T estaba por debajo de 50 pmoles/mg de proteína de membrana/minuto, independientemente del contenido de colesterol de la membrana. Los inventores encontraron una falta similar de transporte significativo de ESG y E3S por las variantes R482G y R482T, independientemente del contenido de colesterol de las vesículas de membranas (no mostrado).

En los experimentos de transporte documentados en la presente memoria, la carga de colesterol de las vesículas antes del experimento de transporte no afectó, mientras que la carga de colesterol durante la preparación de las membranas disminuyó algo (20-30%) el contenido vesicular relativo de las membranas, medido por la actividad de transporte de calcio endógeno. Por lo tanto, cualquier aumento en la actividad del transporte vesicular de ABCG2 está probablemente incluso subestimado (los inventores no realizaron una corrección sistemática basada en esta estimación).

Todos estos experimentos sugieren que el efecto de C-CD era específico para la ABCG2 de tipo natural, y el agotamiento de otros constituyentes lipídicos de las membranas de células Sf9 (por ejemplo, por CD no cargado), un aumento no específico en los lípidos de membranas, o cambios no específicos de permeabilidad (por ejemplo, mediante sitosterol-CD, es decir, vesículas con S-CD o PC) no pudieron explicar los efectos observados.

5.2 Efecto de la carga de colesterol sobre los parámetros cinéticos de transporte de MTX y ESG por ABCG2 y sus mutantes

En los siguientes experimentos los inventores examinaron cómo la carga de colesterol afectaba a los parámetros cinéticos del transporte de MTX y ESG por ABCG2. La Fig. 11.A muestra la dependencia de la concentración de MTX de la absorción de MTX dependiente de ABCG2 en vesículas de membranas de Sf9 control y cargadas con colesterol, respectivamente. En la vesículas de membranas de células Sf9 originales no tratadas (que contenían 6-8 μg de colesterol/mg de proteína de membrana), la velocidad de absorción de MTX fue baja, con una V_{max} aparente de aproximadamente 0,5 nmol de MTX/mg de proteína de membrana/min. En contraste, en las vesículas pretratadas con C-CD (que contenían en este experimento 55 μg de colesterol/mg de proteína de membrana), la absorción de MTX tuvo una V_{max} estimada de aproximadamente 10 nmol de MTX/mg de proteína de membrana/min. La K_m aparente de absorción de MTX fue aproximadamente 0,5 mM en ambos casos, pero la determinación adecuada de los valores de K_m y V_{max} en estos experimentos fue obstaculizada por la baja solubilidad de MTX a concentraciones mayores de 3 mM. La Fig. 11.A también documenta que la variante R482G de ABCG2 tenía una actividad de transporte de MTX muy baja, independientemente de las concentraciones de MTX examinadas.

Cuando los inventores examinaron el efecto del colesterol de las membranas sobre la dependencia de la concentración de ATP, de la absorción de MTX en las vesículas de membranas de Sf9 que contenían ABCG2 encontraron que, independientemente del contenido de colesterol de las membranas, el transporte de MTX tenía una dependencia de ATP saturable, con una K_m aparente de ATP 0,6-0,8 mM y una velocidad de transporte máxima a aproximadamente ATP 5 mM. Estos valores están de acuerdo con los datos de la bibliografía para la dependencia de ATP del transporte vesicular por ABCG2. De nuevo, ninguna de las variantes R482G o R482T mostraron actividad de transporte de MTX, independientemente de la concentración de ATP o del contenido de colesterol de las vesículas de membranas de células Sf9.

En los siguientes experimentos los inventores examinaron la dependencia de la concentración de ESG de la absorción de ESG dependiente de ATP en vesículas de membranas de Sf9 (Fig. 11.B). De manera similar a la observada para MTX, en las vesículas cargadas con colesterol este transporte mostró cinética de saturación sencilla, con una V_{max} aparente de 700 pmol de ESG/mg proteína de membrana/min, mientras que la K_m aparente para ESG fue aproximadamente 45 μM . En vesículas de membranas de Sf9 de control la absorción de ESG era demasiado baja para una estimación adecuada de K_m . También se logró una saturación aparente de esta absorción por encima de de ESG 100 μM , con una V_{max} aparente menor a 50 pmol de ESG/mg de proteína de membrana/min.

Estos experimentos sugieren que la modulación del transporte de MTX y ESG por el colesterol de membranas tiene un efecto predominante sobre la V_{max} , es decir aumentando la capacidad de transporte de sustrato de este transportador activo. El colesterol también puede modular ligeramente la afinidad al sustrato y las interacciones transportador/sustrato, pero los inventores necesitan más estudios en este sentido.

La Fig 11.C demuestra la estimulación del transporte de MTX y ESG en vesículas de membranas de células Sf9 inversas por diferentes niveles del colesterol en las membranas. El efecto del colesterol sobre el transporte vesicular se midió a concentraciones de MTX y ESG (MTX 50 μM y ESG y 25 μM , respectivamente) por debajo de los valores de saturación. En estos experimentos se aplicaron mezclas de preparaciones de membrana, que contenían la misma cantidad de ABCG2 humana, pero cargadas con diferentes niveles de colesterol. Aunque puede observarse una ligera diferencia en estas curvas de activación, el efecto del colesterol sobre ambos transportes de MTX y ESG dependiente de ABCG2 era máximo por encima de 55 μg de colesterol/mg de proteína de membrana. Por lo tanto, la modulación por colesterol de la actividad de transporte de ABCG2 fue la más pronunciada en el intervalo de los niveles de colesterol fisiológicos en diversas membranas celulares de mamíferos.

A modo de resumen, el colesterol de membranas aumentó en gran medida y de forma selectiva el transporte de sustratos por la ABCG2 de tipo natural, mientras que los inventores no encontraron cambios significativos por colesterol en las propiedades de manejo de sustrato de las variantes mutantes de la proteína ABCG2.

5.3. Mediciones de ATPasa en membranas

En los siguientes experimentos los inventores examinaron el efecto de la carga de colesterol sobre la actividad de ATPasa de membranas de las proteínas MDR1 y ABCG2. La actividad de ATPasa de membranas sensible al vanadato bloqueada selectivamente por un inhibidor específico, refleja la actividad de transporte de un número de transportadores ABC multifármacos (Gottesman et al., "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters", Nat Rev Cancer 2 (2002) 48-58; Sarkadi et al., "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system", Physiol Rev 86 (2006) 1179-1236; Sarkadi et al., "Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase", J Biol Chem 267 (1992) 4854-4858]. Como se ha informado anteriormente, la actividad de ABCG2-ATPasa puede ser inhibida específicamente por fumitremorgina C o su análogo, Ko143. Esta actividad de ABCG2-ATPasa "basal" es relativamente alta en vesículas de membranas de células Sf9 aisladas, pero no pudo detectarse una activación de sustrato significativa en el caso de la proteína de tipo natural en las preparaciones de membranas de células Sf9.

La Fig. 12.A muestra la actividad de ATPasa sensible a vanadato de la ABCG2 de tipo natural, así como la de las variantes R482G y R482T, tanto en ausencia como en presencia de dos sustratos transportados potenciales. En estos estudios los inventores seleccionaron prazosina, y el inhibidor de la tirosina-quinasa (EKI) EKI-785, puesto que estos compuestos mostraron ser sustratos tanto para la proteína de tipo natural, así como para las variantes R482G

o R482T de ABCG2 [C. Ozvegy-Laczka, G. Koblos, B. Sarkadi, A. Varadi, "Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition", Biochim Biophys Acta 1668 (2005) 53-63].

En la Fig. 12.A los inventores documentaron las respectivas actividades de ATPasa medidas en dos niveles diferentes de colesterol en las membranas, es decir, en las membranas de células Sf9 de control (6-8 µg de colesterol/mg de proteína de membrana) y cargadas de colesterol (50-65 µg de colesterol/mg de proteína de membrana), respectivamente. Ko143 demostró inhibir completamente y de forma selectiva las actividades de transporte en todas estas variantes de ABCG2, y el nivel de actividad endógena de ATPasa sensible a vanadato en las membranas de células Sf9 de control estaba en el intervalo medido en presencia de Ko143 en las membranas que expresaban ABCG2 (aproximadamente 8-10 nmoles/mg de proteína de membrana/min). Estos datos indican que la fracción sensible al Ko143 de la actividad de ATPasa de membrana se correlacionaba estrechamente con la actividad de la proteína ABCG2.

Como se documenta en la Fig. 12.A, la carga de colesterol de las membranas de células Sf9 no afectó de manera significativa, o sólo aumentó ligeramente la actividad de ATPasa basal de las tres variantes de ABCG2, y no afectó a la baja actividad de la ATPasa de fondo medida en presencia de Ko143. Sin embargo, la carga de colesterol aumentó en gran medida la actividad de ATPasa estimulada por fármacos de la ABCG2 de tipo natural en presencia de ambos sustratos, mientras que no tuvo tal efecto en el caso de las variantes mutantes R482G o R482T. Por lo tanto, el efecto del colesterol sobre la actividad de ATPasa estimulada por fármacos está en estrecha correlación con las alteraciones observadas en el transporte de sustrato vesicular directo, mientras que la actividad de ATPasa basal no puede estar directamente relacionada con este transporte.

En los siguientes experimentos los inventores examinaron los efectos de varios sustratos transportados sobre la actividad de ABCG2-ATPasa (la fracción sensible a Ko143) en membranas de células Sf9 aisladas en un intervalo de concentración de 0,1-50 micromolar. De acuerdo con los estudios anteriores de los inventores, en este sistema no observaron ni obtuvieron sólo una pequeña estimulación de la actividad de ABCG2-ATPasa por los compuestos examinados. Como se muestra en las Figuras 12.B y C, los compuestos ya indicados para ser sustratos transportados de ABCG2, es decir el inhibidor de tirosina-quinasa Iressa (Gefitinib), el topotecán ampliamente aplicado, el metabolito irinotecán SN38, el agente anticancerígeno experimental flavopiridol, y el compuesto flavonoide quercetina, produjeron todos una importante estimulación de la actividad de ABCG2-ATPasa en las membranas de células Sf9 cargadas con colesterol (Fig. 12.B), mientras que sólo hubo una pequeña estimulación en las membranas de control (Fig.12.C). En el caso de la quercetina y algunos inhibidores de tirosina-quinasa se observó esta estimulación ya en concentraciones sub-micromolares y produjeron muy altos niveles máximos de actividad de ATPasa. Estos datos muestran que en membranas de Sf9 cargadas con colesterol se puede llevar a cabo de manera eficiente y confiable el cribado del sustrato ABCG2, basado en la medición de la actividad de la ATPasa sensible a Ko143.

6. Mediciones de atrapamiento de nucleótidos

Con el fin de explorar el mecanismo molecular del efecto del colesterol sobre ABCG2 humana, los inventores examinaron el atrapamiento de nucleótidos sensible al vanadato en membranas de células Sf9 aisladas de control y cargadas con colesterol, respectivamente. Los transportadores de ABC más activos forman un compuesto intermedio catalítico, estabilizado por la presencia de vanadato, que puede ser visualizado por foto-reticulación dependiente de UV y marcado covalente por la alfa-³²P-8-azido-ATP [Gottesman et al., "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters", Nat Rev Cancer 2 (2002) 48-58]. Como los inventores documentaron anteriormente, en el caso de ABCG2 este experimento requiere el uso de Co-alfa-³²P-8-azido-ATP, y el atrapamiento de nucleótidos es totalmente dependiente de vanadato.

En nuestros experimentos de atrapamiento de nucleótidos anteriores, llevados a cabo en membranas de células Sf9 que contenían ABCG2-humana, se encontró que en el caso de ABCG2 de tipo natural la adición de fármacos, por ejemplo, prazosina, no aumentó, sino que disminuyó ligeramente la formación de este producto intermedio (véase Ozvegy et al., "Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation", J Biol Chem 277 (2002) 47980-47990]. En contraste, el atrapamiento de nucleótidos en la variante ABCG2-R482G fue aumentado significativamente por los sustratos transportados.

En el estudio actual los inventores repitieron estos experimentos en membranas de células Sf9, que expresaban ABCG2, sin o con precarga de colesterol. Como se muestra en la Fig. 13, en las membranas de células de Sf9 de control el atrapamiento de nucleótidos dependiente de vanadato fue muy bien medido, pero la adición de prazosina o EKI solo disminuyó ligeramente la formación de este compuesto intermedio. Cuando se calculan los valores medios en tres experimentos independientes, corregidos por el control de carga de inmunotransferencia de ABCG2, el marcado de ABCG2 relativo disminuyó hasta 45% por prazosina y hasta 55% por EKI. La carga de colesterol no alteró el nivel básico de atrapamiento de nucleótidos por ABCG2 (el valor medio relativo del marcado de ABCG2 fue 105%). Sin embargo, la adición de prazosina (un aumento relativo hasta 125%), o incluso más significativamente, de EKI (un aumento hasta 180%), estimuló el atrapamiento de nucleótidos en las membranas cargadas con colesterol, en contraste con la fuerte disminución producida por estos fármacos en las membranas de control no cargadas. En estos estudios de atrapamiento de nucleótidos se obtuvieron resultados similares en dos momentos de tiempo diferentes

(2 minutos y 5 minutos). En todos los casos la adición de Ko143 eliminó el atrapamiento de nucleótidos dependiente de ABCG2.

En el caso de la variante mutante ABCG2-R482G, la estimulación por prazosina y EKI del atrapamiento de nucleótidos estaba ya presente en las membranas de control, y en este caso los inventores no encontraron diferencia significativa por enriquecimiento en colesterol de las membranas de células Sf9 en el presente estudio (datos no mostrados).

Estos experimentos indican un efecto significativo de colesterol de membranas sobre la velocidad de atrapamiento de nucleótidos por la proteína ABCG2 humana. En correlación con la aceleración observada del transporte de sustrato vesicular directo, y la aparición de actividad de ATPasa estimulada por fármacos, se encontró que la carga de colesterol promovía la estimulación por fármaco de la formación del compuesto intermedio catalítico, lo que indicaba una estimulación por colesterol de la renovación del transportador de tipo natural.

6. Experimentos para comparar las membranas de Sf9 cargadas y no cargadas con colesterol que contenían el transportador ABCB11

6.1 Comparación de la actividad de ATPasa de la membrana ABCB11 de ratón cargada y no cargada con colesterol.

La actividad de ATPasa basal sensible al vanadato de vesículas de ABCB11 de ratón no tratadas aumentó desde 37 nmol Pi/mg de prot/min hasta 64 nmol Pi/mg prot/min en presencia de tauroquenodesoxicolato (Fig. 14.A). Después de la carga de colesterol, la actividad basal disminuyó hasta 4,7 nmol Pi/mg prot/min que podía ser activada hasta 39 nmol Pi/mg prot/min por tauroquenodesoxicolato (Fig. 14.B). Este método dio como resultado una mejor relación señal a ruido para el ensayo de ATPasa de ABCB11 de ratón en comparación con las membranas no cargadas que es más adecuado para cribar compuestos.

Se observaron diferencias significativas en la activación por taurocolato y glicocolato usando vesículas de ABCB11-Sf9 de ratón no tratadas y tratadas (Fig.14.A, B).

6.2 Efecto de la carga de colesterol sobre la actividad de transporte vesicular del transportador ABCB11 humano/de ratón/de rata.

Al igual que en los ensayos de ATPasa, se utilizaron vesículas de membranas "inversas" y los ensayos se caracterizaron por la absorción dependiente de ATP de los sustratos marcados. El colesterol aumentó la actividad de transporte de taurocolato de vesículas preparadas a partir de células Sf9 que contenían el transportador ABCB11 de rata/humano/de ratón (Fig.15.A, B, C). Este efecto se observó en el grado más alto en el caso de la actividad de transporte de ABCB11 de rata (Fig.15.A.). Los valores de K_m y V_{max} fueron calculados usando la hipótesis de que era aplicable la cinética de Michaelis-Menten. Como se ve en la Tabla 3, mientras que los valores de V_{max} aumentaron de manera significativa, los valores de K_m cambiaron sólo ligeramente.

Tabla 3. Valores K_m y V_{max} calculados usando la ecuación de Michaelis-Menten

	ABCB11de rata-Sf9+Coolest.	ABCB11 de rata-Sf9-CTRL	ABCB11 humana-Sf9-CTRL	ABCB11 humana-Sf9+Coolest.	ABCB11de ratón-Sf9-CTRL	ABCB11de ratón-Sf9+Coolest.
Valores con el mejor ajuste						
V_{max} (pmol TC/mg prot/min)	121,3	14,54	169,4	323	1199	1843
K_m (μM)	19,55	2,203	15,03	17,04	6,798	7,608

Aplicaciones y ventajas

Los inventores han descrito que el fenómeno es adecuado para ajustar sistemas de ensayo siendo una realización preferida en comparación con la conocida en la técnica.

5 *Un importante resultado de la presente invención es que usar membranas precargadas con colesterol esta tecnología permite el cribado de una amplia variedad de moléculas sustratos midiendo la actividad de ABCG2-ATPasa.*

10 Realmente la carga de colesterol mejoró específicamente la tasa de ATPasa estimulada por fármacos y la velocidad máxima de transporte para los sustratos estudiados en experimentos de transporte vesicular. La carga de colesterol de membranas de células de insectos hace que sus propiedades de transporte y de ATPasa sean similares a las de las membranas de mamíferos que contienen altos niveles de colesterol endógeno. Por tanto, el transportador ABC cargado con colesterol, por ejemplo, ABCB11 o ABCG2 que sobre-expresan membranas de células de insectos son modelos adecuados para estudiar la función transportadora.

15 Abreviaturas: Transportadores ABC: transportadores casetes de unión a ATP (*ATP binding cassette*); ABCP: transportador ABC específico de placenta (*placenta specific ABC transporter*); ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción; BCRP: proteína de resistencia al cáncer de mama (*breast cancer resistance protein*); CD: ciclodextrina, C-CD: ciclodextrina cargada con colesterol, S-CD: ciclodextrina cargada con sitosterol, EKI: inhibidor de tirosina-quinasa EKI-785, ESG: estradiol-17-beta-glucurónido, E3S: estrona-3-sulfato, MDR1: proteína 1 de resistencia a multifármacos; MRP1: proteína 1 asociada a resistencia a multifármacos; MTX: metotrexato, MXR, proteína asociada a la resistencia a mitoxantrona; P-gp: P-glicoproteína; PheA: Feoforbida A, PNGase F: Péptido-N-glicosidasa F; RAMEB: β-ciclodextrina metilada aleatoriamente; células Sf9: células de ovario de *Spodoptera frugiperda*.

20

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de membranas de células de insectos o preparación de células de insectos cargada con colesterol para estudiar la interacción de un compuesto y una proteína transportadora ABC (casete de unión a ATP) determinando la actividad de dicha proteína transportadora ABC,
5 comprendiendo dicha preparación un mayor nivel de colesterol en las membranas en comparación con el nivel de colesterol fisiológico del mismo tipo de membrana de células de insectos, comprendiendo dicha preparación de membranas de células de insectos o preparación de células de insectos una proteína transportadora ABC, en donde dicha proteína transportadora ABC es ABCG2 (proteína transportadora ABC G2) o ABCB11 (una proteína transportadora ABC B11),
10 teniendo dichas ABCG2 o ABCB11 una mayor actividad de transporte de sustrato en comparación con la actividad de transporte de sustrato de dicha proteína ABCG2 o ABCB11 si está presente en el mismo tipo de membrana de célula de insectos que tiene un nivel de colesterol fisiológico.
2. La preparación de la reivindicación 1, en donde el nivel de colesterol en la membrana es:
- al menos 50% del nivel de colesterol correspondiente de una membrana de célula de mamífero,
15 o
- al menos 2 veces el nivel de colesterol endógeno de una membrana de célula de insecto.
3. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la actividad de transporte de sustrato es al menos 1,5 veces mayor que la actividad de transporte de sustrato de dicha proteína transportadora ABC si está presente en una preparación de membranas de células de insectos de control del mismo tipo que tiene un nivel de
20 colesterol fisiológico cuando se analiza por:
a) un ensayo de transporte vesicular y/o
b) un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato.
4. Un kit de reactivos para determinar la actividad de ATPasa estimulada por sustrato o de transporte vesicular de una proteína transportadora ABC, en donde dicha proteína transportadora ABC es ABCG2 o ABCB11, comprendiendo dicho kit:
25 - la preparación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y/o
- medios para expresar ABCG2 o ABCB11 como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en células de insectos y medios para cargar las células de insectos con colesterol y opcionalmente medios para preparar una preparación de membranas a partir de las células de insectos, y
30 - si se desea, cualquiera de los siguientes: sustratos de la proteína transportadora ABC, ATP, colesterol, tampones, reactivos, controles, inhibidores o activadores de la proteína transportadora ABC.
5. Un método para fabricar una preparación de células de insectos o una preparación de membranas de células de insectos, que comprende una proteína transportadora ABC que tiene mayor actividad de transporte de sustrato, para uso en un ensayo de proteína transportadora ABC,
35 en donde dicho método comprende:
- proporcionar ABCG2 o ABCB11 en una preparación de células de insecto o en una preparación de membranas de células de insectos como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
- cargar la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos con colesterol, con lo cual se aumenta el nivel de colesterol de la preparación de células de insectos o de la preparación de
40 membranas de células de insectos.
6. Un método de ensayo para estudiar la interacción de un compuesto y una proteína transportadora ABC determinando la actividad de dicha proteína transportadora ABC, en donde dicho método de ensayo comprende las etapas de:
45 - proporcionar una proteína ABCG2 o ABCB11 activa en una preparación de membranas de células de insectos o de membranas de células de insectos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u obtenible por un método de acuerdo con la reivindicación 5,
- poner en contacto un compuesto con la proteína ABCG2 o ABCB11,
- medir la actividad de transporte de sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB 11 por un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato y/o por un ensayo de transporte vesicular en presencia y en ausencia de dicho compuesto,
50

- comparar los valores de actividad obtenidos en presencia y ausencia del compuesto, en donde la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos tiene un mayor nivel de colesterol en comparación con el nivel de colesterol fisiológico de membranas de células de insectos.

5 7. Un método de ensayo de la reivindicación 6 para analizar la interacción simultánea de al menos dos compuestos y una proteína ABCG2 o ABCB11 determinando la actividad de la proteína transportadora, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

10 - proporcionar una proteína activa ABCG2 o ABCB11 en una preparación de células de insectos o en una preparación de membranas de células de insectos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u obtenible por un método de acuerdo con la reivindicación 5,

- poner en contacto un primer compuesto con la proteína ABCG2 o ABCB11,

- medir la actividad de transporte de sustrato de la proteína ABCG2 o ABCB11 por un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato y/o la actividad de transporte vesicular en presencia y ausencia de dicho primer compuesto,

- comparar los valores de actividad obtenidos en presencia y en ausencia de dicho primer compuesto,

15 - poner en contacto un segundo compuesto con la proteína transportadora ABC en presencia del primer compuesto,

- medir la actividad de transporte de sustrato de la proteína transportadora ABC por un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato y/o la actividad de transporte vesicular en presencia del primero y segundo compuesto simultáneamente,

20 - comparar los valores de actividad obtenidos en presencia y en ausencia del segundo compuesto,

- evaluar el efecto del segundo compuesto sobre la actividad en presencia del primer compuesto,

en donde

la preparación de células de insectos o la preparación de membranas de células de insectos es una preparación como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 8. Un uso de colesterol para aumentar la actividad de transporte de sustrato en un ensayo para estudiar la interacción de un compuesto y una proteína ABCG2 o ABCB11 determinando la actividad de una proteína transportadora ABC insertada en una membrana de células de insectos o en una preparación de células de insectos o en una preparación de membranas de células de insectos.

30 9. El uso de la reivindicación 8, en donde se usa colesterol en forma de un complejo de colesterol y una ciclodextrina.

35 10. Un uso de una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una preparación obtenible por un método de acuerdo con la reivindicación 5, en un ensayo de la proteína ABCG2 o ABCB11 para estudiar la interacción de un compuesto y una proteína ABCG2 o ABCB11 determinando la actividad de dicha proteína ABCG2 o ABCB11.

11. El uso de la reivindicación 10, en donde la actividad de la proteína transportadora ABC se analiza por:

a) un ensayo de transporte vesicular y/o

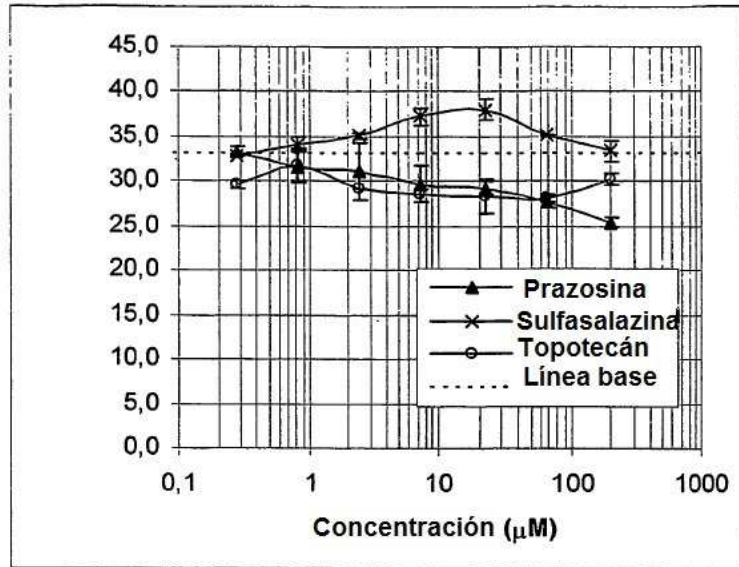
b) un ensayo de ATPasa estimulada por sustrato.

40

Fig. 1

A

Actividad de ATPasa sensible al vanadato
(nmol Pi/mg de prot. de membrana/min)



B

Actividad de ATPasa sensible al vanadato
(nmol Pi/mg de prot. de membrana/min)

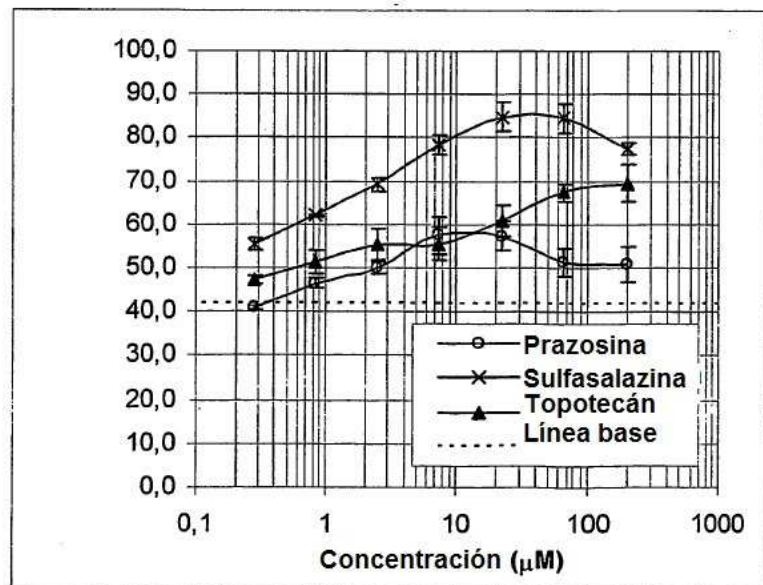


Fig. 1

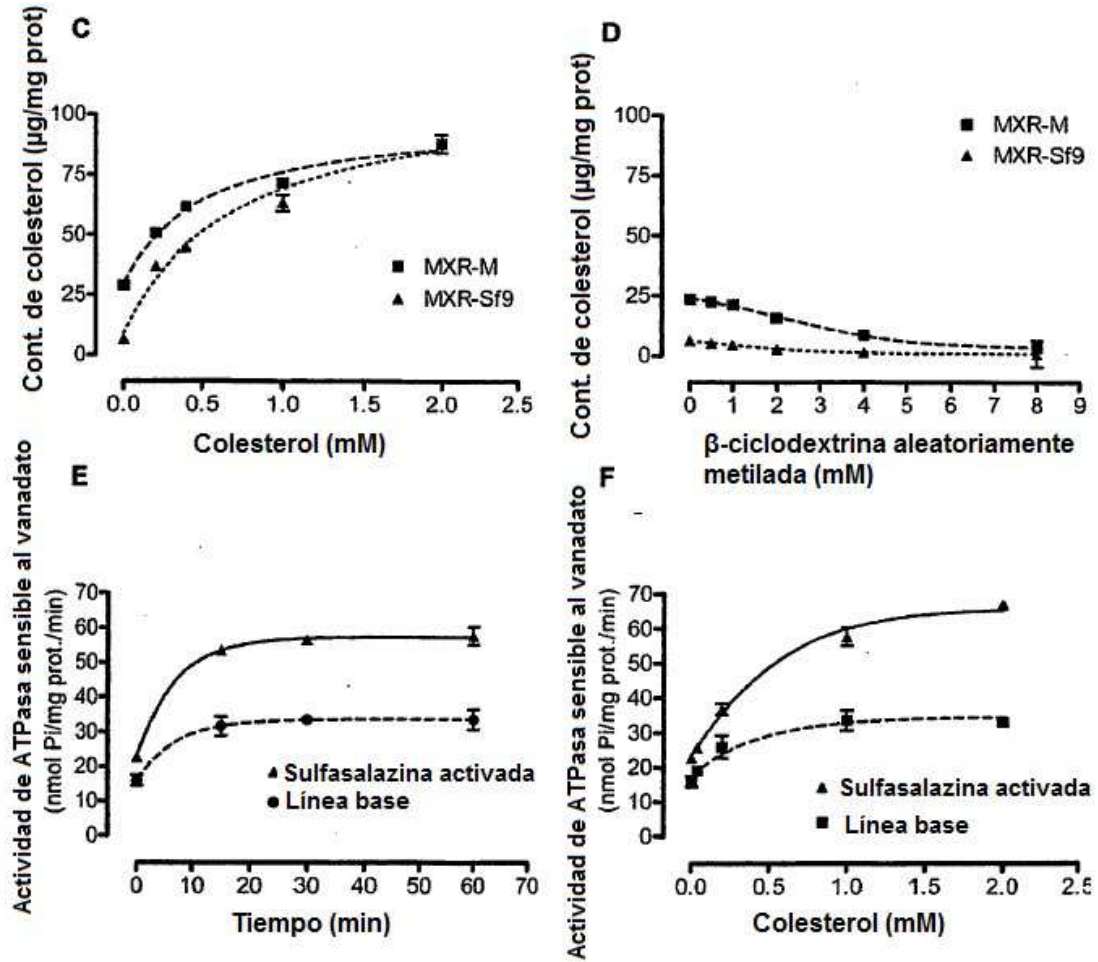


Fig. 2

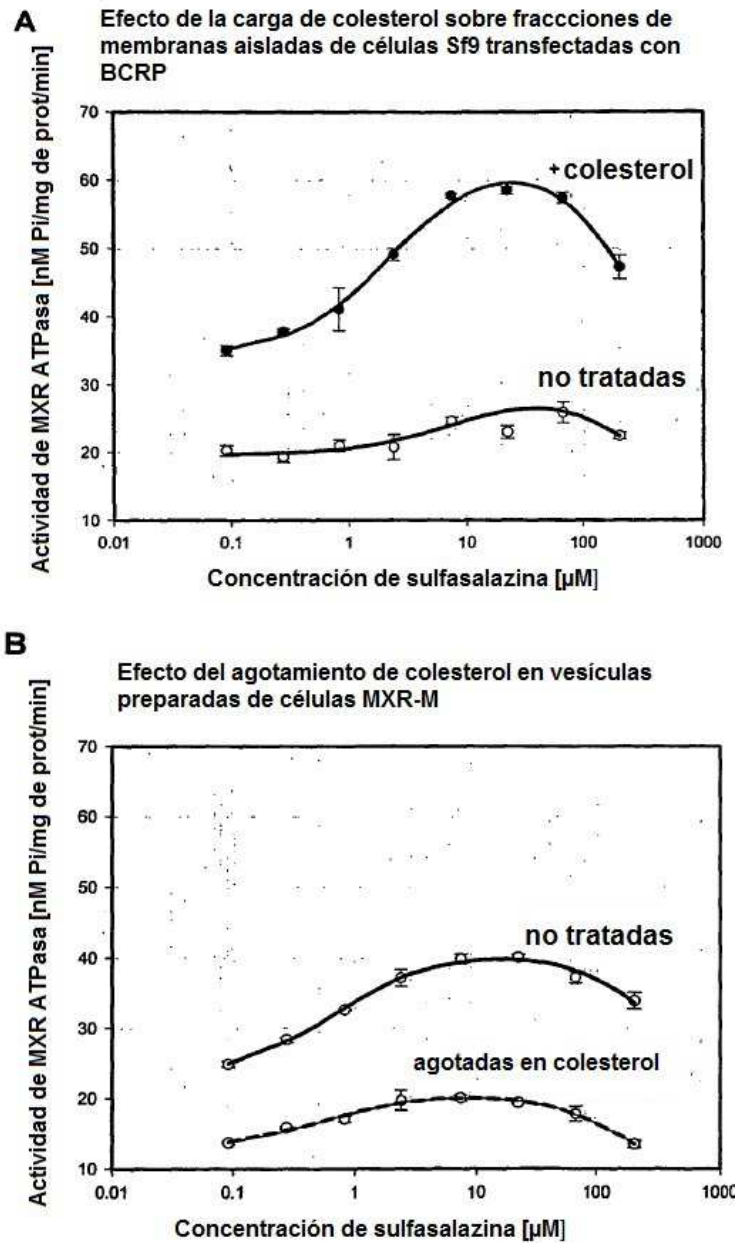


Fig. 2

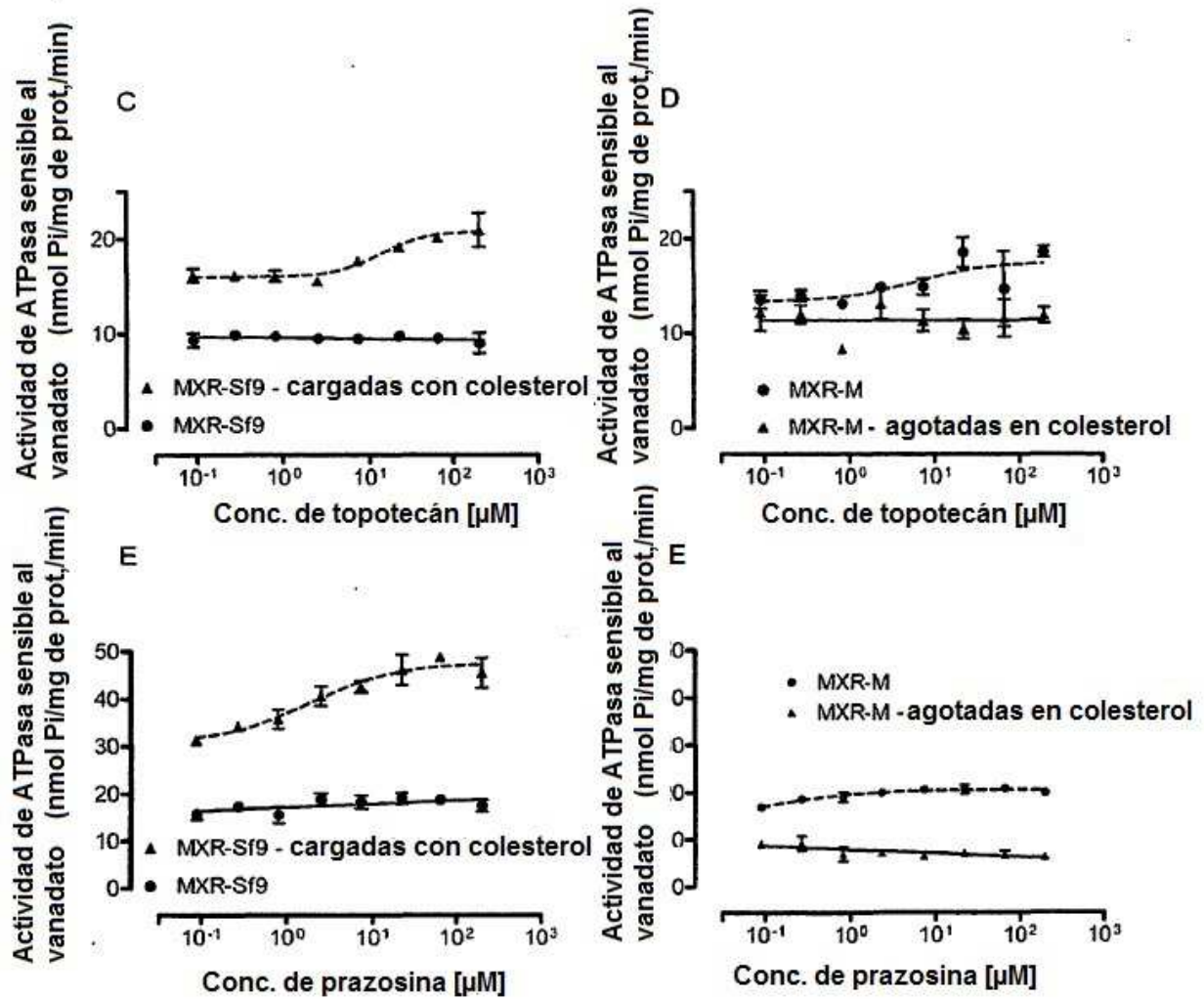
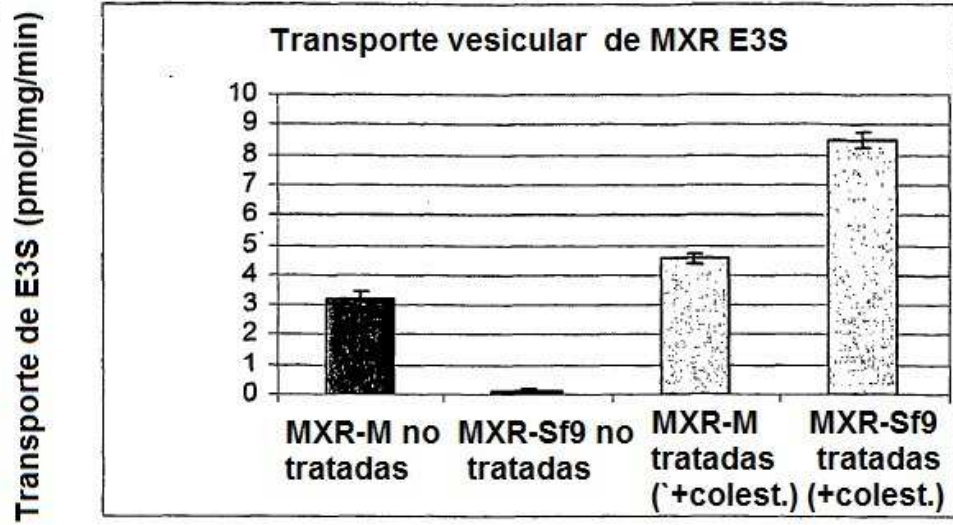


Fig. 3

A



B

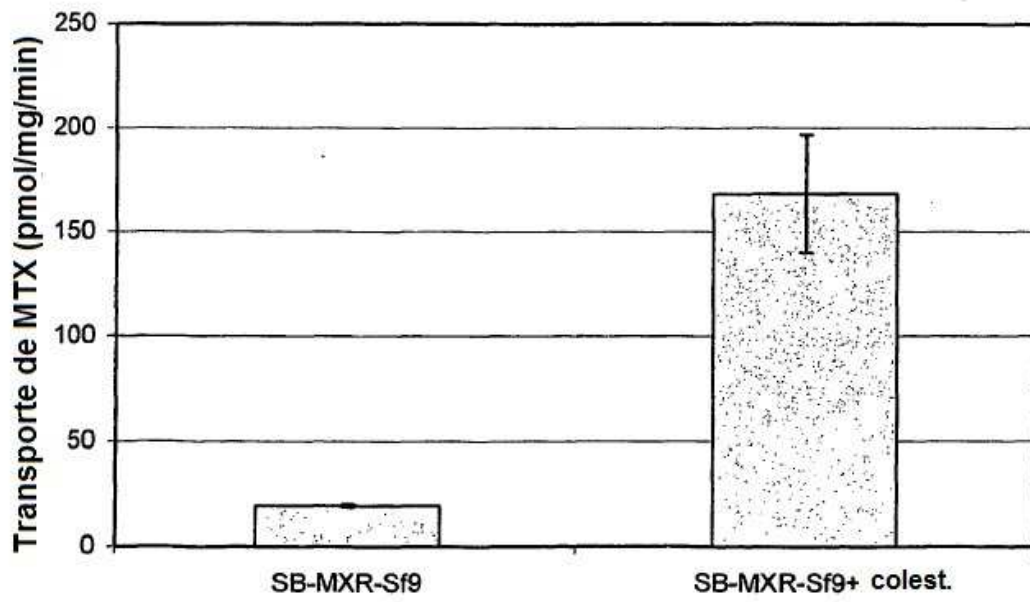


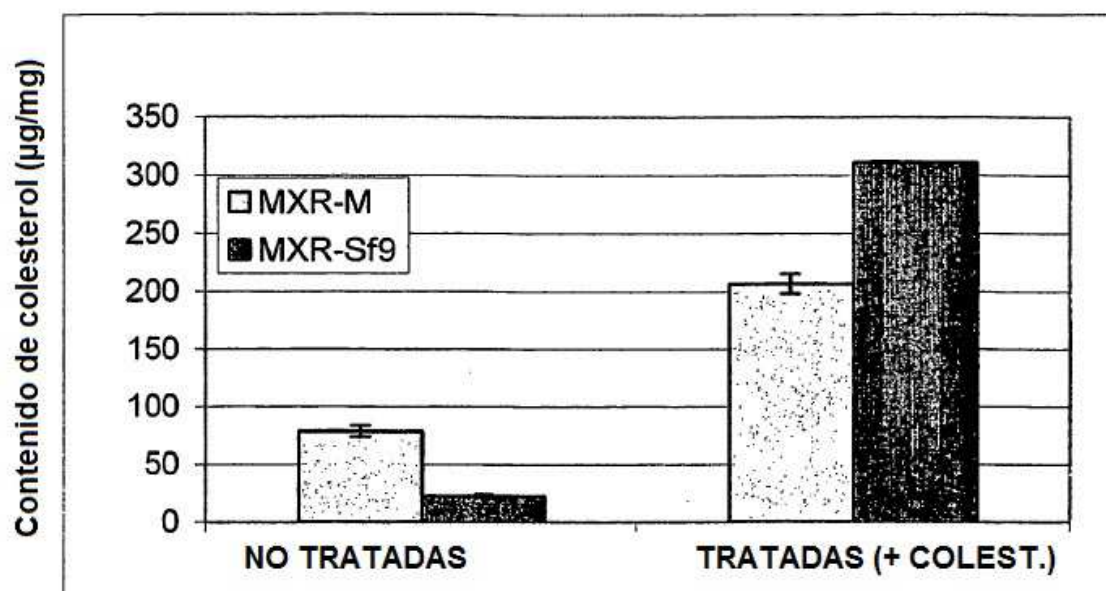
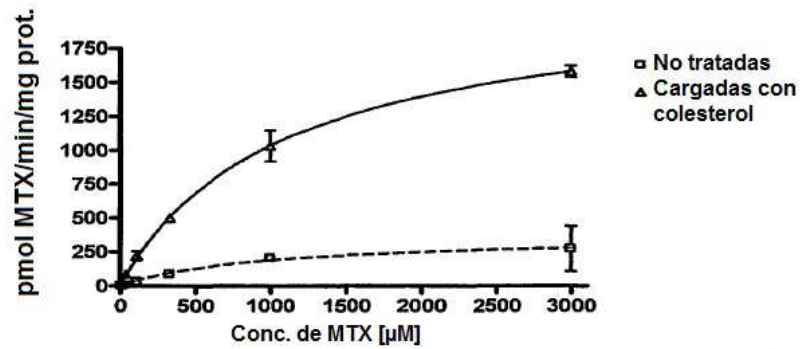
Fig. 3**Contenidos de colesterol****C**

Fig. 4

A Efecto de la carga de colesterol sobre células Sf9 con MXR (transporte de metotrexato)



	No tratadas	Cargadas con colest.
	$\pm$ D.T.	$\pm$ D.T.
Vmax	367,2 $\pm$ 21,91	2144 $\pm$ 29,92
Km	935,2 $\pm$ 142,2	1068 $\pm$ 36,46

	No tratadas	Cargadas con colesterol
Bondad del ajuste	5	5
Grado de libertad	0.9943	0.9997
R ²		

B

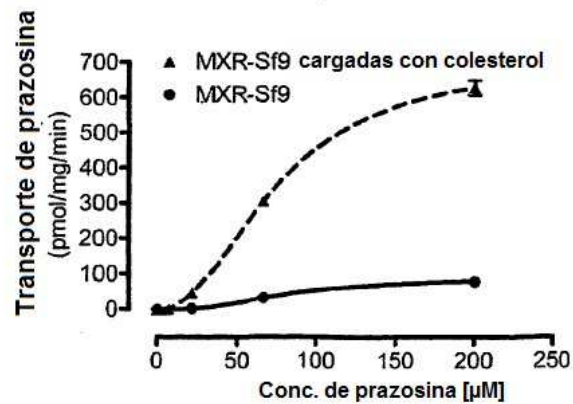


Fig. 5

MXR-Sf9 E3S tipo natural

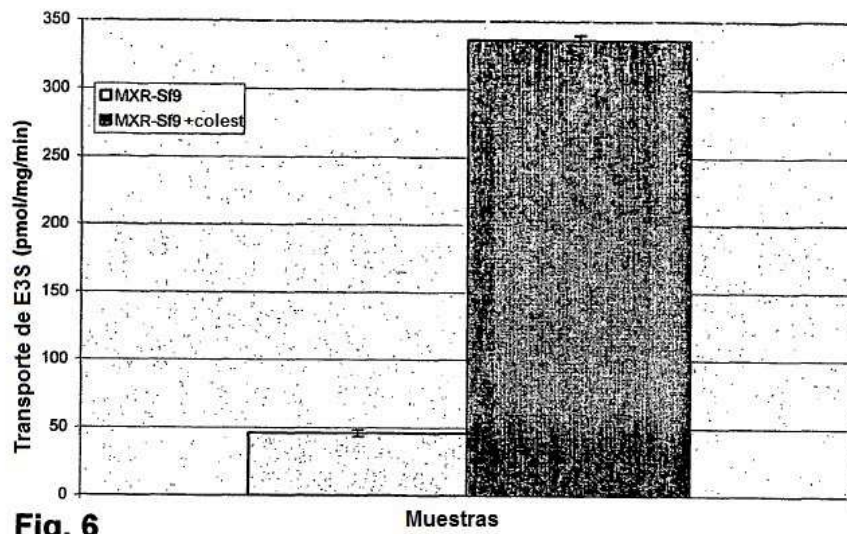


Fig. 6

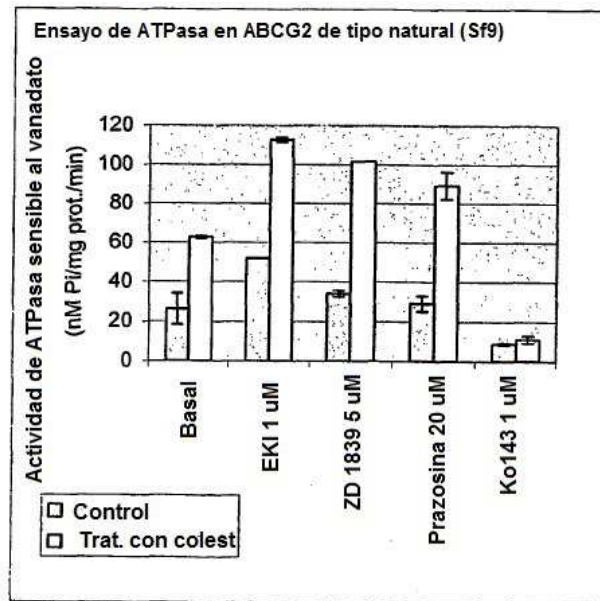


Fig. 7

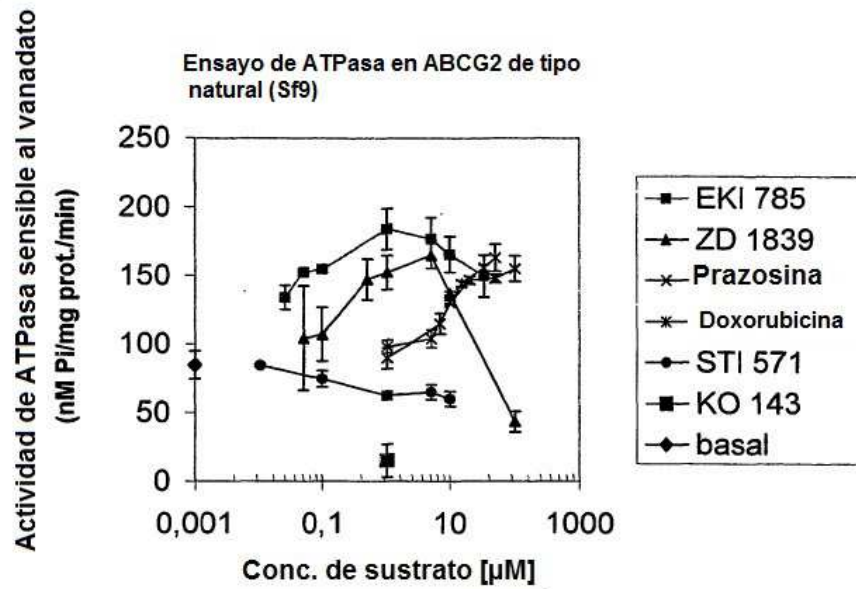


Fig. 8

Ensayo de ATPasa en ABCG2 de tipo natural (Sf9)
(carga de colesterol en células vivas)

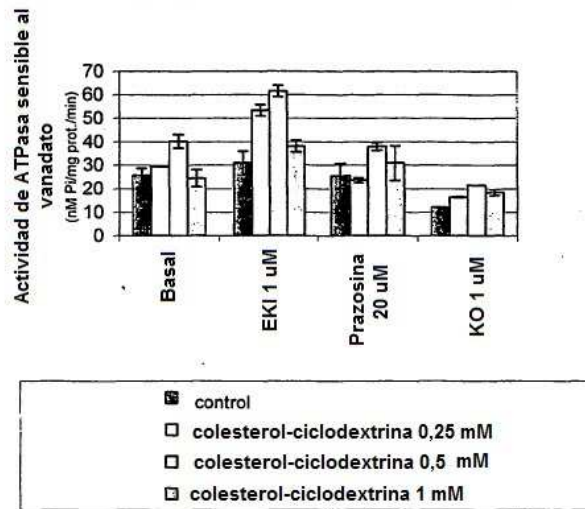


Fig. 9A

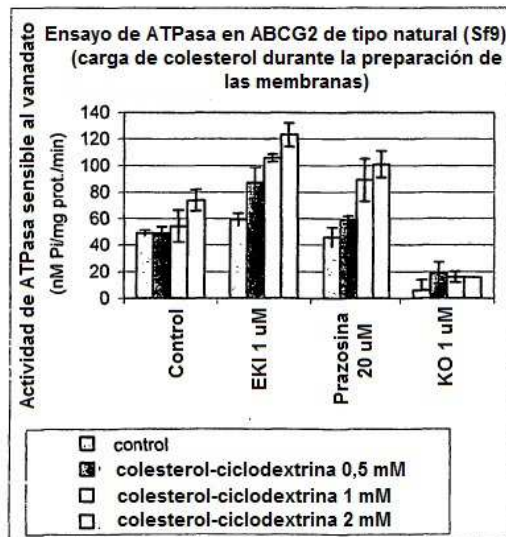


Fig. 9B

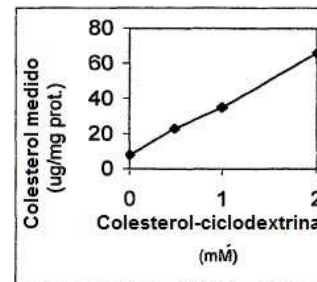


Fig. 10

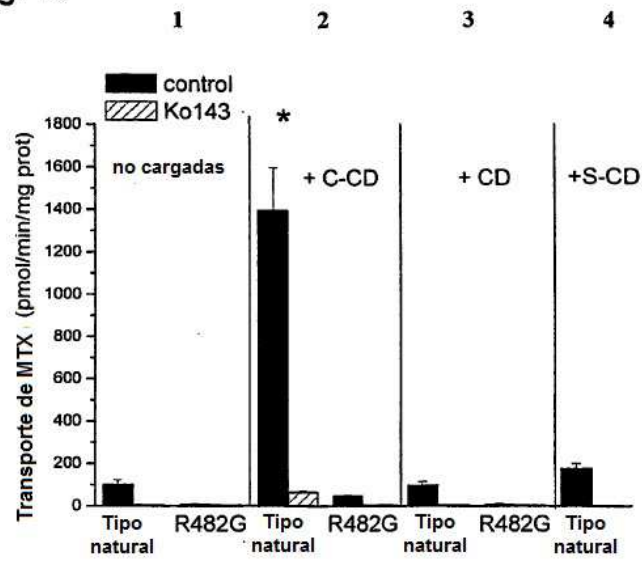


Fig. 11A

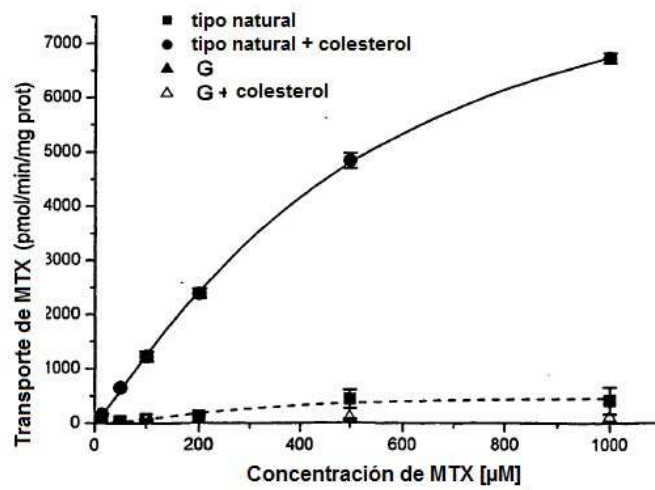


Fig.11B

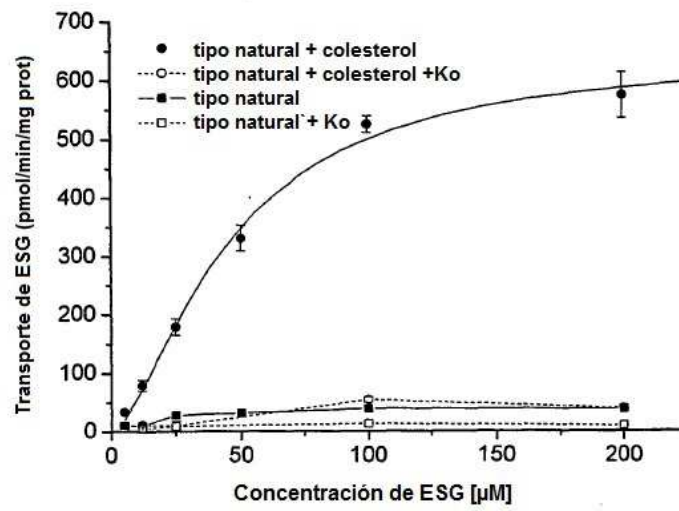


Fig. 11C

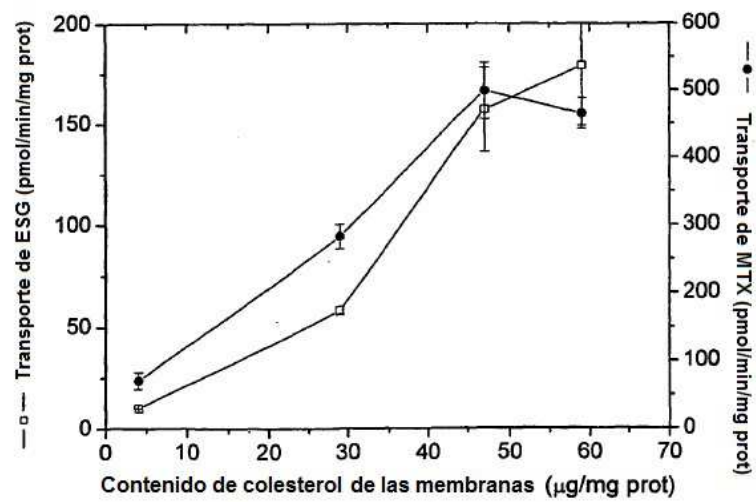


Fig. 12A

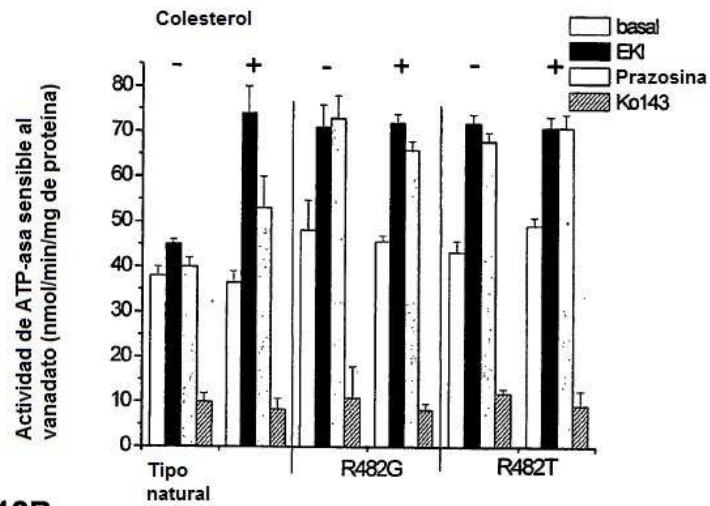


Fig. 12B

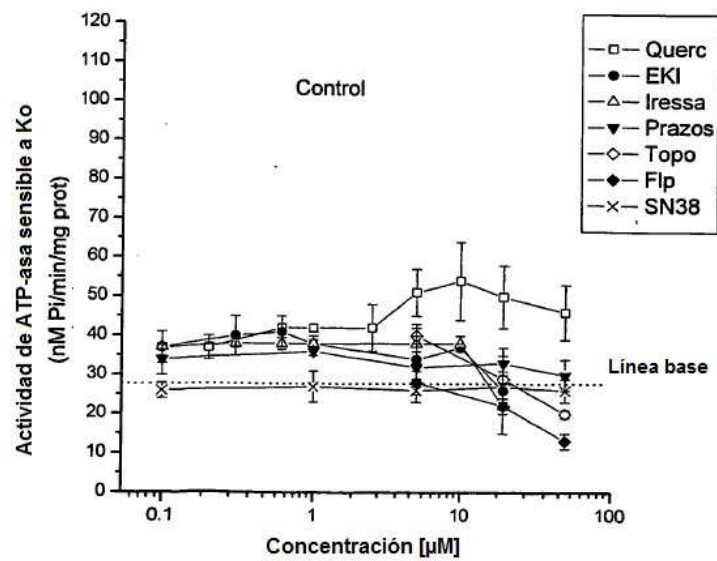


Fig. 12C

Panel II.

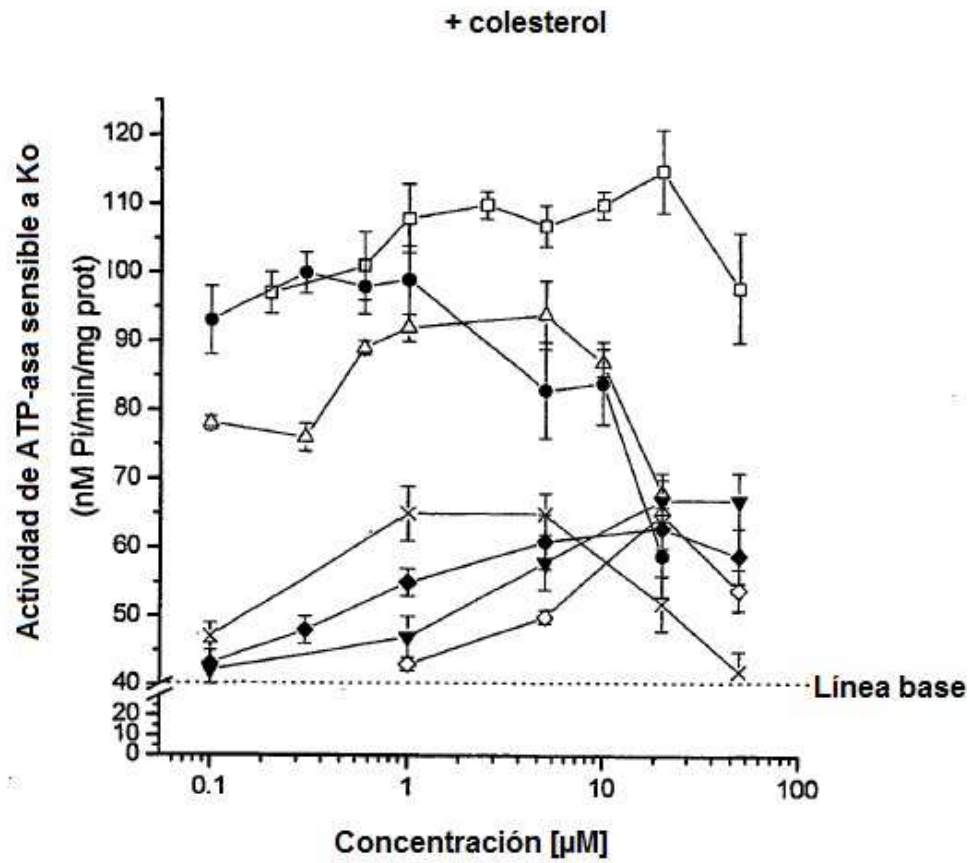
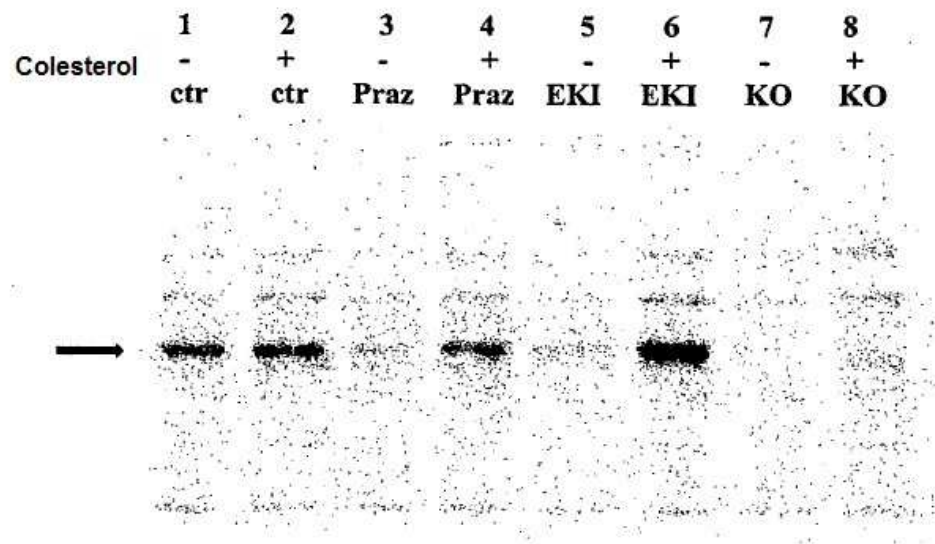


Fig. 13

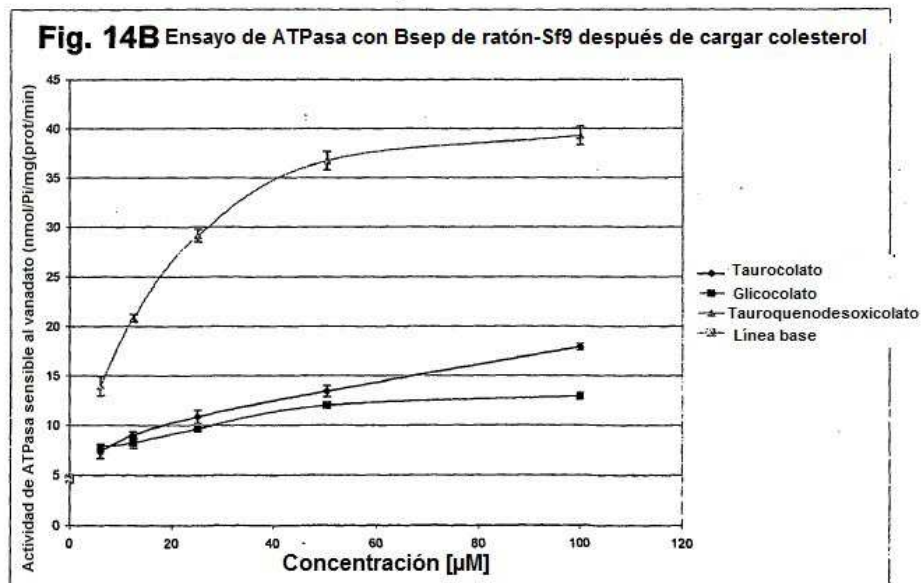
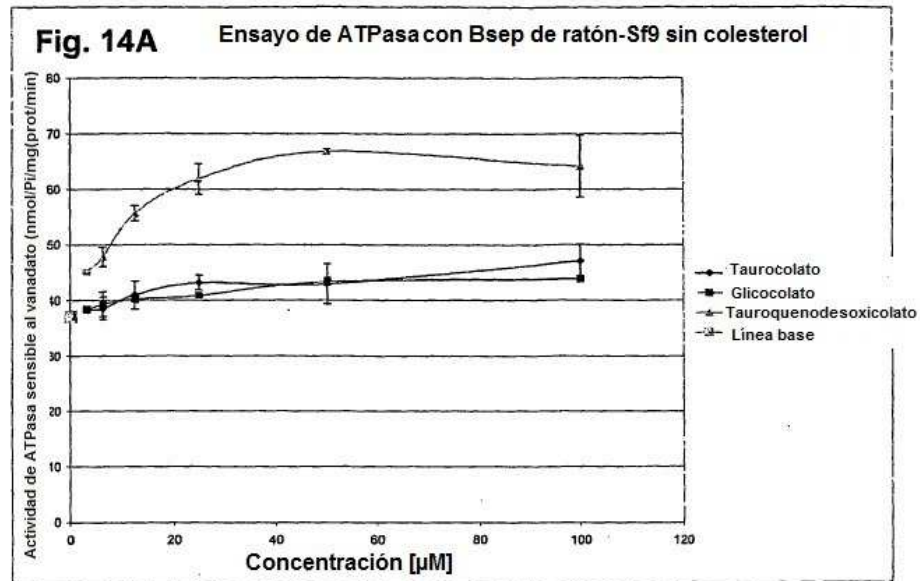


Fig. 15.A

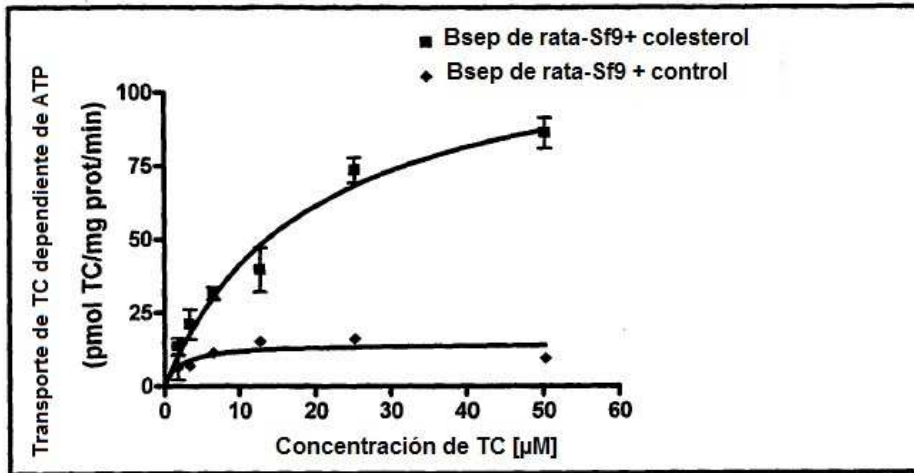


Fig. 15.B

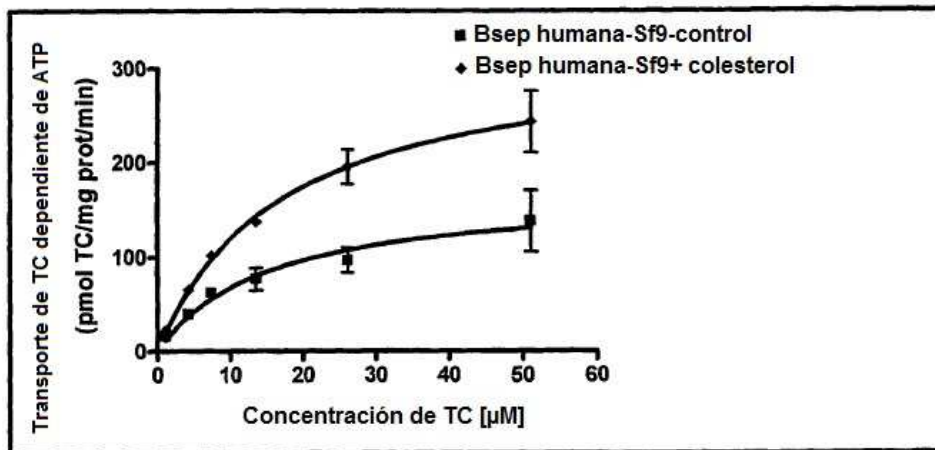


Fig. 15.C