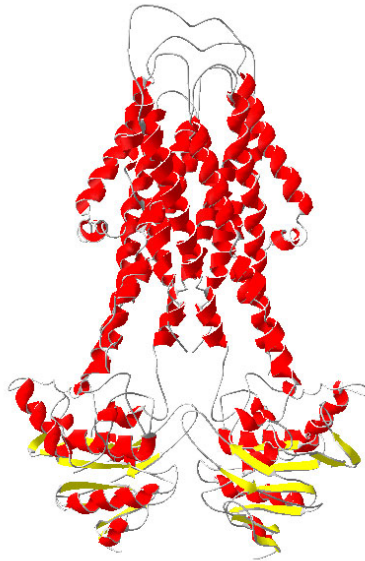




**Instituto de
Parasitología & Biomedicina
"López-Neyra"**



Universidad de Granada

Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos como revertidores naturales de la resistencia celular a múltiples fármacos causada por la Glicoproteína-P MDR1 humana

**Memoria del trabajo de investigación presentada por el Licenciado
D. Francisco Muñoz Martínez
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada**

Octubre de 2005

Directores de la Tesis

Dr. Santiago Castanys Cuello

Dr. Francisco Gamarro Conde

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Muñoz Martínez
D.L.: Gr. 1924 - 2005
ISBN: 84-338-3620-x

D. Francisco Gamarro Conde y D. Santiago Castanys Cuello, Científicos Titulares del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que el trabajo **“Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos como revertidores naturales de la resistencia celular a múltiples fármacos causada por la Glicoproteína-P MDR1 humana”** ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) de Granada, por **D. Francisco Muñoz Martínez**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, para optar al grado de Doctor por esta misma Universidad.

En Granada, a 21 de Octubre de 2005.

Fdo. Dr. Santiago Castanys Cuello

Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde

Resumen

RESUMEN

La sobre-expresión de transportadores de múltiples fármacos de la **superfamilia ABC (ATP-binding cassette)** es uno de los varios mecanismos a los que microorganismos patógenos y células tumorales pueden recurrir para producir un **fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR)**. Son varios los transportadores ABC para los que se ha demostrado una implicación directa en el fenotipo MDR de células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Pero la **P-glicoproteína humana (Pgp MDR1)** es, de entre todos los transportadores de fármacos, el mejor estudiado con diferencia.

Se han identificado centenares de compuestos capaces de revertir *in vitro* el fenotipo MDR causado por Pgp, pero muy pocos han demostrado ser efectivos revertidores MDR *in vivo*. En consecuencia, la necesidad de descubrir nuevas familias de compuestos capaces de inhibir específicamente esta proteína está plenamente justificada.

Nuestros estudios sobre inhibidores selectivos de la Pgp MDR1 humana se han centrado en los **sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de plantas de la familia *Celastraceae***. Esta familia de plantas se ha venido usando durante siglos en medicina tradicional en diversas partes del mundo para el tratamiento de varias enfermedades, y los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos son sus principios activos más importantes. Estos compuestos naturales poseen una **diversidad estructural enorme**, y su amplísimo rango de actividades biológicas (insecticidas naturales, supresores de tumores, antibióticos, antiinflamatorios, citotóxicos, etc.) los convierte en **atractivos candidatos para el desarrollo de fármacos con múltiples aplicaciones terapéuticas**: entre ellas, la **capacidad de revertir el fenotipo MDR de células tumorales**.

Esta pretensión se ve apoyada por el hecho de que varios trabajos han demostrado previamente la capacidad de algunos de tales sesquiterpenos para revertir la resistencia a fármacos, tanto en células tumorales como en líneas MDR

de protozoos parásitos del género *Leishmania*. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se estudian con detalle las bases moleculares de tal actividad farmacológica.

El presente **trabajo de tesis doctoral** se ha fijado como **objetivo general el estudio de la actividad de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de *Celastraceae* como potenciales revertidores de la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales**. Dicho estudio se centró en la **caracterización del mecanismo molecular de acción de estos compuestos como inhibidores de la Pgp MDR1 humana**, con la intención de emplear este conocimiento para el **diseño racional de potentes inhibidores de esta bomba de fármacos basados en la estructura molecular de estos compuestos naturales**.

Conocer las bases moleculares de esta actividad inhibidora permitiría el desarrollo de modelos computerizados de predicción de actividades (modelos **QSAR**: quantitative structure-activity relationships). Tales modelos, sobre la base de los datos de actividad farmacológica acumulados para todos los sesquiterpenos estudiados, podrían predecir la actividad de un sesquiterpeno dado sólo a partir de su estructura molecular. Esto sería una herramienta inestimable para el diseño racional de nuevos inhibidores más potentes de Pgp, basados en la estructura de dihidro- β -agarofuranos, **con una potencial aplicación clínica en el tratamiento quimioterapéutico de tumores resistentes a citotóxicos**

Hemos confirmado la capacidad de estos compuestos naturales para revertir el fenotipo MDR debido a la sobre-expresión de la Pgp humana, y también hemos esclarecido su mecanismo molecular de acción: **los sesquiterpenos estudiados revierten el fenotipo MDR porque funcionan como inhibidores de la actividad de transporte de fármacos de la Pgp**. Esta **actividad inhibidora del transporte de fármacos de Pgp es, además, muy específica**, pues los sesquiterpenos no afectan, en cambio, la actividad de otros homólogos humanos

de Pgp, como las bombas de fármacos **MRP1** (ABCC1), **MRP2** (ABCC2) y **BCRP** (ABCG2).

Los sesquiterpenos, para ejercer su acción farmacológica, **se unen a Pgp en sus dominios transmembrana (TMDs)**, produciendo como consecuencia de dicha unión sutiles cambios conformacionales en la proteína. Funcionan como **inhibidores no competitivos de sus dos actividades, ATPasa y de transporte de fármacos**. Dicha unión de los sesquiterpenos a Pgp **dificulta la unión de fármacos a los TMDs, pero no afecta la unión del ATP a los dominios de unión a nucleótido (NBDs)**. Por lo tanto, la inhibición que provocan de la actividad ATPasa de Pgp debe resultar de un **efecto alostérico** que los sesquiterpenos ejercen desde su sitio de unión en los TMDs, y que **disminuye la capacidad de la proteína para hidrolizar el ATP, pero no para unirlo**.

Además, hemos demostrado que **los sesquiterpenos no son transportados por Pgp (o lo son sólo muy pobremente) a través de las membranas celulares**, pues su flujo de entrada y de salida de las células por difusión sólo se ve afectado por la bomba cuando ésta se sobre-expresa hasta niveles muy elevados. Esto concuerda con la **incapacidad de Pgp para conferir resistencia a sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos**, como también demostramos en este trabajo. Del mismo modo, **otros homólogos humanos de Pgp (las bombas de fármacos MRP1, MRP2 y BCRP) son igualmente incapaces de transportar eficientemente sesquiterpenos** a través de las membranas celulares. Además, los más potentes sesquiterpenos naturales inhibidores de Pgp **no modifican la expresión de la proteína**.

También hemos determinado que **los sesquiterpenos naturales poseen al menos dos sitios de unión en los TMDs**, de alta y baja afinidad, respectivamente, y **al menos uno de ellos solapa físicamente con los sitios de unión de los moduladores clásicos verapamil y ciclosporina A** (dos inhibidores clásicos de Pgp). En cambio, dicho sitio(s) es físicamente diferente del sitio de unión del sustrato vinblastina, de los dos sitios de unión que la proteína

posee para progesterona (uno en los TMDs y otro en los dominios de unión de ATP), y del sitio de unión del inhibidor de 3ª generación GF120918.

Finalmente, intentamos realizar un análisis comparativo de cómo la naturaleza de los sustituyentes químicos del esqueleto agarofuránico, y el patrón de tal sustitución, determinan la potencia inhibidora de los sesquiterpenos estudiados. La conclusión más importante de tal análisis fue que las relaciones de estructura-actividad de estos compuestos naturales son muy complejas, y que **no se puede extraer conclusiones directas y fáciles en relación a cómo la naturaleza química de un sustituyente en una posición específica puede afectar a la potencia inhibidora del compuesto**. Como pauta general, sólo se observa que **el grado global de esterificación** del compuesto (cuanto más mejor), y la **presencia de dos motivos éster aromáticos**, son importantes determinantes de la actividad. Sin embargo, la presencia de **un átomo de nitrógeno terciario protonado no es esencial** para la actividad de los sesquiterpenos, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de inhibidores de Pgp conocidos.

En conclusión, la complejidad de las relaciones de estructura-actividad de estos inhibidores de Pgp es tal que **sólo modelos tridimensionales asistidos por ordenador podrán ser de alguna utilidad para predecir la actividad de los dihidro- β -agarofuranos basándose en su estructura**.

Todos estos hallazgos completan, pues, nuestro trabajo de caracterización del mecanismo de acción molecular de dihidro- β -agarofuranos como inhibidores específicos de Pgp. Las conclusiones globales apuntan a esta familia de compuestos como poseedora de una **estructura molecular privilegiada que podría explotarse para el diseño racional de fármacos** con potencial aplicación terapéutica en la inhibición de Pgp, tanto en tejidos sanos como en células tumorales.

Introducción

I. CÁNCER Y SU QUIMIOTERAPIA

La palabra **cáncer** se utiliza para describir un complejo y heterogéneo grupo de estados patológicos en el que las células proliferan descontroladamente e invaden y dañan tejidos vecinos. El **cáncer es una enfermedad de carácter genético**, que se produce al ser eliminadas las restricciones que limitan la división celular en células y tejidos ya diferenciados (Evan GI y Vousden KH, 2001); en la mayoría de los casos es una enfermedad adquirida y, con frecuencia, de carácter irreversible, con un elevado índice de mortandad en personas mayores de 40 años.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/cancer/en/>), el **cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados**, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. 11 millones de personas en todo el mundo son diagnosticadas de algún tipo de cáncer cada año (**Figura 1**), de las que 7 millones fallecen por esta causa (12,5 % de todas las muertes anuales debidas a enfermedad en el planeta). Las estadísticas muestran que en España, a pesar de ser uno de los países con menor incidencia de cáncer dentro de Europa, 82.000 personas mueren cada año como consecuencia de esta enfermedad.

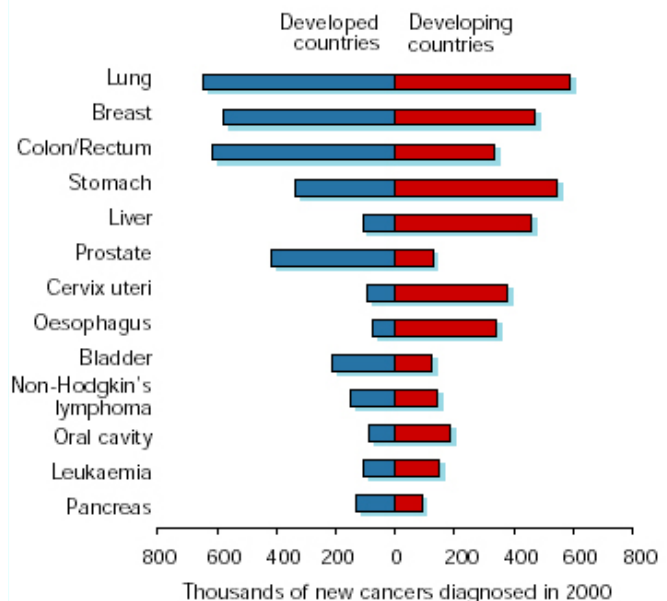


Figura 1: Incidencia global del cáncer en países desarrollados y en vías de desarrollo

El **cáncer no es una única enfermedad**, sino una familia de, al menos, 100 enfermedades distintas aunque relacionadas. La incidencia de cáncer aumenta con la edad, lo que indica que existe un factor acumulativo de causas responsable de que

un único evento no sea suficiente para desencadenar, de modo inmediato, un cáncer. La **aparición de un cáncer** no se debe, pues, a un único factor sino a la **combinación de varios factores** que se engloban en dos grupos: la **herencia genética** y el **ambiente**. La herencia de versiones anormales de algunos genes es responsable de la predisposición a padecer algunos tipos de cáncer. Por otra parte, en la aparición de la mayoría de los cánceres influye, sobre todo, la exposición a agentes químicos y radiaciones que afectan a las células alterando sus genes, así como los hábitos de vida (tabaco, alcohol, dieta,...), y algunas infecciones (ciertos virus causantes de papilomas genitales, de la hepatitis B,...). En definitiva, el cáncer es un grupo de enfermedades de origen multigénico y multifactorial.

I.1. ¿Por qué y cómo mata el cáncer?

En la actualidad el cáncer se manifiesta clínicamente como una afección, a menudo irreversible, curable principalmente por eliminación de aquellas células que han sufrido la transformación patológica. Aunque parece haber casos de remisión espontánea del cáncer, debido probablemente a una respuesta inmunológica muy efectiva, **la mayoría de los cánceres evolucionan inexorablemente a estadios cada vez más malignos**, como es de esperar tratándose de células genéticamente alteradas y con una ventaja proliferativa con respecto al resto de las células del organismo.

La causa del fallo de los tratamientos y de la muerte de los pacientes con cáncer es casi siempre la *metástasis*. La capacidad de formar metástasis se basa en la adquisición de **invasividad** por las células del tumor primario (Gassmann P et al., 2004). **La invasividad es, por tanto, la característica esencial del cáncer**. Se sabe que el cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones y se conocen muchas mutaciones que explican el aumento en la proliferación celular, pero aún muy poco sobre las mutaciones responsables de que las células se hagan invasivas. La **progresiva acumulación de mutaciones**, probablemente en una secuencia específica para cada tipo celular, **origina primero una hiperplasia** o crecimiento

desordenado, y **luego invasividad celular**, vascularización o **angiogénesis** y, finalmente, **metástasis** (Bogenrieder T y Herlyn M, 2003).

Este proceso de invasión ocasiona, por tanto, la diseminación de las células tumorales. Hoy se cree que el proceso de aparición de células invasivas comienza en una fase relativamente temprana del crecimiento del tumor primario. Es decir, que **la metástasis requiere tumorigenicidad e invasividad**, procesos que se inician en este orden pero que se solapan parcialmente, de modo que mutaciones que proporcionan a las células tumorales la capacidad de invadir y formar posteriormente metástasis se comienzan a acumular ya durante la fase de crecimiento del tumor primario. Desgraciadamente, es muy probable que cuando se detecta inicialmente un tumor existan ya en él células que son potencialmente invasivas y/o angiogénicas. Debido precisamente a la posibilidad de que alguna haya escapado ya de la masa tumoral, bien a la sangre, a la linfa o al tejido circundante, aparecen las metástasis transcurrido un tiempo (a veces, varios años) después de la eliminación del tumor primario.

1.2. Tratamiento del cáncer mediante quimioterapia

De los muchos retos de la medicina moderna, pocos han tenido un comienzo más controvertido ni experimentado un progreso más dificultoso que el del tratamiento y cura del cáncer (Chabner BA y Roberts TG Jr, 2005). Aunque **los procesos neoplásicos fueron reconocidos durante siglos**, poco o nada se sabía sobre los mecanismos biológicos de transformación y progresión tumoral hasta el advenimiento de la medicina molecular en la segunda mitad del siglo XX. Antes de 1950, la terapia del cáncer era todavía jurisdicción exclusiva de la cirugía. La radioterapia no se convirtió en una herramienta clínica útil para el control localizado de las enfermedades tumorales hasta después de 1960, con la invención del acelerador lineal. Pero, al igual que la cirugía, ésta tampoco servía para erradicar cánceres metastáticos. **El tratamiento efectivo de muchos tipos de cáncer requiere llegar a cada tejido u órgano del cuerpo**. Es por ello que los fármacos

citotóxicos, las moléculas biológicas y las terapias inmunológicas han acaparado la mayor parte de los esfuerzos actuales para curar el cáncer.

Desde los primeros experimentos con mostazas nitrogenadas hace 60 años, hasta los actuales intentos de desarrollar fármacos específicos contra dianas vitales en células tumorales, investigadores de múltiples disciplinas científicas han aunado esfuerzos en la búsqueda de fármacos anticancerosos más eficaces (**Figura 2**). Con el tiempo, el desarrollo de tales fármacos ha pasado de basarse fundamentalmente en observaciones empíricas a depender cada vez más del conocimiento detallado de la biología celular y molecular de los tumores. Esto ha permitido el desarrollo de fármacos cada vez más potentes y selectivos para el tratamiento del cáncer.

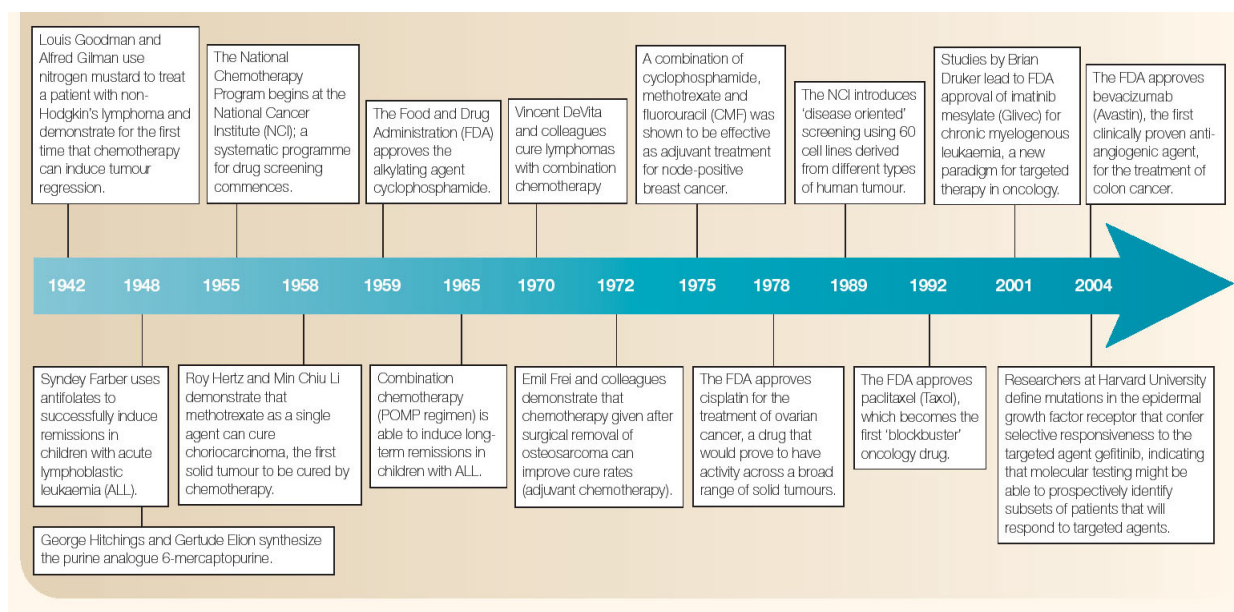


Figura 2: Historia de la quimioterapia del cáncer. Tomado de *Chabner BA y Roberts TG, 2005*

Durante millones de años de evolución, **los organismos vivos han perfeccionado agentes citotóxicos para matar a otros organismos sin matarse a sí mismos**, proporcionándonos de éste modo los inestimables **antibióticos** con los que curar enfermedades bacterianas sin matar las células eucariotas del hospedador humano. Algunas sustancias naturales inhiben

específicamente muchas de las estructuras celulares y de las funciones vitales para la supervivencia en células tumorales. Desgraciadamente, **la naturaleza no ha creado "antibióticos" contra el cáncer**, y tales sustancias naturales son capaces de matar células tumorales precisamente porque comparten dianas moleculares con las células normales.

La mayoría de los cánceres carecen de una única diana vital y específica que los haga sensibles a un fármaco en particular sin atacar también a las células sanas del paciente. Por ello, **la especificidad de la quimioterapia contra el cáncer sólo puede conseguirse limitadamente, explotando las sutiles diferencias, no siempre aparentes, que existen a nivel molecular entre células sanas y cancerosas**, y que la moderna biología celular y molecular han puesto, y siguen poniendo, de manifiesto. Sin embargo, **tales diferencias no siempre existen** o, de existir, no siempre son explotables clínicamente para nuestro provecho. Hay muchísimos agentes naturales citotóxicos, tales como los fármacos que inhiben microtúbulos o los que dañan ADN, que son excepcionalmente potentes pero no específicos de las células tumorales. En tales casos, otra manera de incrementar la especificidad de acción de los tratamientos contra el cáncer podría ser la de crear artificialmente, mediante **combinaciones racionales de citotóxicos**, regímenes terapéuticos **que afecten preferentemente funciones celulares de células tumorales**. Tales combinaciones podrían ser, por la naturaleza de las células en cuestión, mutuamente antagónicas en células sanas, pero aditivas e incluso sinérgicas a la hora de provocar muerte en células tumorales (Blagosklonny MV, 2005).

Las ventajas de los **tratamientos contra el cáncer basados en una combinación de fármacos** con diferentes dianas celulares y mecanismos de acción farmacológica no radican sólo en la posibilidad de **incrementar la especificidad** de acción de la quimioterapia, como hemos comentado arriba, sino también en **augmentar su efectividad**. Ya en la década de los 60 se demostró que, en general, el empleo combinado de fármacos citotóxicos era mucho más efectivo que el uso de un único agente, tanto para el tratamiento de cánceres metastáticos como para

evitar la reaparición de tumores en pacientes con alto riesgo estadístico de recidiva después de la extirpación quirúrgica de un tumor.

Finalmente, el abordaje genético y molecular de la biología celular de los tumores ha permitido la **identificación de múltiples nuevas dianas de acción citotóxica en células cancerosas con potencial interés terapéutico**. Tales nuevas dianas resultaron en su mayoría ser elementos **constituyentes de insospechadas redes de señalización intracelular** encargadas del control de la proliferación, supervivencia y muerte celulares y que, en el caso de las células tumorales, estaban radicalmente alteradas, ofreciendo así la posibilidad de explotar esas diferencias moleculares y funcionales para optimizar la quimioterapia de numerosos tipos de cáncer. Entre tales dianas figuran ***receptores de factores de crecimiento, moléculas señalizadoras, proteínas reguladoras del ciclo celular, moduladoras de la apoptosis*** y moléculas ***promotoras de la angiogénesis*** (Hanahan D y Weinberg RA, 2000). Este conocimiento ha supuesto una revolución, y ha abierto una nueva era en la terapia del cáncer, la de la ***terapia específica de diana*** o **"targeted-therapy"** (Sawyers C, 2004), cuyo desarrollo aún estamos viviendo y que tiene perspectivas muy prometedoras. Sin embargo, como veremos más adelante, el camino hacia el éxito terapéutico con esta nueva clase de quimioterapias no será más fácil que el recorrido durante el desarrollo de los fármacos citotóxicos tradicionales, pues los principios clínicos básicos sobre el tratamiento del cáncer y la resistencia a fármacos, establecidos entre 1950 y 1980 (Chabner BA y Roberts TG Jr, 2005) serán, muy probablemente, también aplicables a las nuevas terapias desarrolladas y por desarrollar.

II. MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS EN CÉLULAS TUMORALES

II.1. Las células tumorales son intrínsecamente muy heterogéneas

Numerosos estudios sobre el perfil de expresión de genes en **tumores humanos** han puesto de manifiesto que éstos **poseen una gran diversidad genética**, sea cual sea su tipo histológico, lo que hace que su sensibilidad a un tratamiento determinado sea también variable y que, para la mayoría de los tipos de cáncer, tan sólo una fracción del total de pacientes responda satisfactoriamente al tratamiento, sea cual sea el fármaco o combinación de fármacos empleados, incluso aquellos desarrollados más recientemente. Esta **resistencia a fármacos** es el principal problema que limita la eficacia de las quimioterapias empleadas para tratar el cáncer.

II.2 Los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, o desarrollar resistencia durante el curso del tratamiento

Algunos tipos de tumores son intrínsecamente resistentes ya desde el inicio del tratamiento, demostrándose en algunos casos que, gracias a la mutabilidad inherente de las células tumorales, existen en el tumor subclones mutantes resistentes a fármacos incluso antes de iniciarse el tratamiento. Otros tipos de tumor, en cambio, demuestran ser sensibles a la quimioterapia al comienzo del tratamiento, pero son capaces de adquirir resistencia a fármacos tras sucesivas rondas de quimioterapia. Una característica particularmente frustrante de esta resistencia adquirida a fármacos es que los tumores que adquieren resistencia no sólo lo hacen frente al fármaco que se usó originalmente contra ellos, sino que **“aprenden” a resistir la acción citotóxica de otros fármacos a los que nunca antes fueron expuestos** y que pueden tener diferentes mecanismos de acción farmacológica. Éste fenómeno es conocido como **resistencia a múltiples fármacos** o **MDR** (del

inglés “multidrug resistance”) y, bien intrínseca o adquirida, se calcula que es la **causa del fallo del tratamiento en alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastático** (Longley DB y Johnston PG, 2005). Claramente, si tan pernicioso fenómeno clínico pudiera ser evitado, el porcentaje de curación y supervivencia tras el tratamiento del cáncer se podría incrementar enormemente.

II.3 Mecanismos multicelulares de MDR

Hay **dos clases generales de resistencia** a fármacos anticancerosos: aquella que resulta del **contexto multicelular del tumor**, y la debida a **alteraciones genéticas y/o epigenéticas de la propia célula tumoral**, y que afectan a su sensibilidad a los fármacos. Las dificultades que encuentran los agentes citotóxicos para llegar efectivamente a los tumores pueden ser debidas a una pobre absorción intestinal cuando se administran por vía oral, y a que pueden ser rápidamente metabolizados y/o excretados, lo que resulta en bajos niveles plasmáticos de quimioterapia y en una difusión reducida de ésta desde la sangre hasta el interior de la masa tumoral (Pluen A et al., 2001; Jain RK, 2001a). Estudios recientes han enfatizado la importancia del grado de vascularización de los tumores y de la existencia de un apropiado gradiente de presión para el correcto acceso de los fármacos a todas las células de un tumor (Jain RK, 2001b). Además, algunas células de cáncer son sensibles a la quimioterapia cuando son cultivadas como monocapas, pero se vuelven resistentes cuando son transplantadas a animales modelo (Green SK et al., 1999). Esto parece indicar que factores ambientales como la matriz extracelular o la propia geometría del tumor podrían contribuir al fenómeno de resistencia a

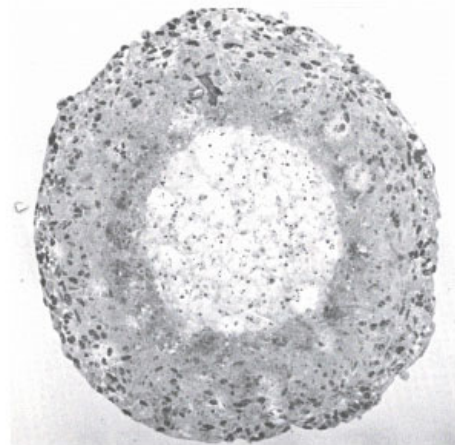


Figura 3: Esferoide de múltiples células tumorales, con el típico centro necrótico y la franja externa de células en división activa.

fármacos. Células cancerosas crecidas en cultivo como **esferoides tridimensionales** (Mueller-Klieser W, 2000; **Figura 3**), que reproducen la geometría tumoral in vivo, se vuelven también multirresistentes (Durand RE y Olive PL, 2001). Esta **resistencia multicelular** a fármacos no es debida sólo a una cuestión meramente biofísica inherente a la propia estructura del tumor (geometría, permeabilidad de la matriz extracelular, pobre difusión a través de uniones estrechas entre células, etc.), sino que, como en la resistencia exclusivamente celular, en este caso también existen factores moleculares que pueden contribuir a la resistencia a fármacos. Entre tales factores figuran la **inhibición de la apoptosis**, la presencia de un **centro tumoral hipóxico con alta proporción de células quiescentes**, la **modulación de la expresión de topoisomerasas y enzimas reparadoras**, etc. (Desoize B y Jardillier JC, 2000). Se ha descubierto recientemente que las interacciones específicas entre las células cancerosas dentro del tumor, y entre éstas y elementos de la matriz extracelular, mediadas por moléculas de adhesión (**integrinas**) expresadas en las membranas celulares, originan cascadas de transducción de señales y reorganizaciones del citoesqueleto que tienen como respuesta final la inhibición de la apoptosis y la promoción de la supervivencia y la división celular (Shain K y Dalton WS, 2001).

Así pues, sólo por el mero hecho de crecer adheridas unas a otras o a la matriz extracelular, las células tumorales ya poseen resistencia intrínseca a fármacos. Es mucho lo que queda por conocer de los mecanismos moleculares de esta **resistencia a fármacos debida a adhesión celular (CAM-DR: cell adhesion-mediated drug resistance)**, pero lo que ya se conoce demuestra que el contexto social de las células tumorales no se puede obviar si se pretenden encontrar formas eficaces de revertir la resistencia a fármacos y de mejorar la eficacia de las terapias antitumorales.

II.4 Mecanismos celulares de MDR

Los mecanismos celulares de resistencia a múltiples fármacos se han estudiado intensamente, dado que es bastante fácil obtener experimentalmente modelos

celulares del fenómeno mediante selección *in vitro* de líneas celulares expuestas a agentes citotóxicos (Roninson IB et al., 1986). Las células cancerosas en cultivo pueden hacerse resistentes a un único fármaco, o bien a una clase de fármacos con un modo de acción similar, alterando la diana intracelular o incrementando la capacidad de reparación de los daños causados por el/los fármaco(s), frecuentemente en el ADN de las células. Tras ser seleccionadas para ser resistentes a ese único fármaco o familia de fármacos, las células también pueden manifestar resistencia cruzada frente a otros fármacos estructural y funcionalmente muy diferentes – es el **fenómeno MDR** que ya definimos. Lamentablemente, la MDR en pacientes clínicos de cáncer es mucho más frecuente de lo que jamás se sospechó en los tiempos en que la quimioterapia del cáncer daba sus primeros pasos en clínica. Esta elevadísima incidencia podría explicar por qué los tratamientos que combinan múltiples fármacos, cada uno con una diana celular diferente, no son, en general, más efectivos que los tratamientos con un único agente quimioterapéutico una vez que la MDR está establecida en los tumores.

Se han descrito diferentes tipos de MDR celular. La resistencia a fármacos naturales hidrofóbicos – a veces conocida como **MDR clásica** – generalmente resulta de la sobre-expresión en las membranas celulares de **bombas transportadoras de fármacos de amplia especificidad**, capaces de expulsar los fármacos fuera de las células con **gasto de ATP** (Gottesman MM et al., 2002). Estas bombas de fármacos ATP-dependientes pertenecen a la **superfamilia de proteínas ABC** (ATP-binding cassette) (Higgins CF, 1992). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 50 genes humanos que codifican para tales proteínas, organizados en 7 subfamilias (ABCA-ABCG, si bien los miembros de las subfamilias ABCE y ABCF no son transportadores propiamente dichos) basándose en la homología de secuencia y organización de sus dominios estructurales (Dean M, 2001). La resistencia debida a la expresión de estas proteínas ATPasas transmembrana se debe a que el **incremento en el eflujo de fármacos fuera de las células** disminuye su concentración intracelular y, en consecuencia, su capacidad para causar daños en la célula. Los fármacos afectados por la MDR clásica incluyen **alcaloides de la Vinca** (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, etc.), **antraciclinas** (daunorubicina,

doxorubicina, adriamicina, etc.), **taxanos** (paclitaxel, docetaxel), **actinomicina-D**, **mitoxantrona** y un largo etcétera (**Figura 5**), que componen el grueso del arsenal quimioterapéutico disponible actualmente para el tratamiento clínico de los cánceres humanos (Ambudkar SV, 1999).

Figura 4: Transportadores ABC relacionados con MDR clásica, y los sustratos que transportan.

Common Name	Other Names	Systematic Name	Chemotherapy Substrates
P-gp	MDR1	ABCB1	actinomycin-D bisantrene daunorubicin docetaxel doxorubicin etoposide homoharringtonine mitoxantrone ⁵³ paclitaxel teniposide topotecan vinblastine vincristine vinorelbine
MDR2	—	ABCB4	paclitaxel vinblastine
MRP1	—	ABCC1	doxorubicin epirubicin etoposide methotrexate vincristine vinorelbine ⁵⁴
CMOAT	MRP2	ABCC2	cisplatin doxorubicin etoposide methotrexate mitoxantrone vincristine
BCRP	MXR, ABC-P	ABCG2	daunorubicin doxorubicin mitoxantrone SN-38 topotecan

P-gp = p-glycoprotein
MDR = multidrug resistance
MRP = multidrug resistance protein
CMOAT = canalicular multi-organic anion transporter
BCRP = breast cancer resistance protein
MXR = mitoxantrone resistance
ABC = ATP-binding cassette

Hay otros casos en que los fármacos tampoco se acumulan a las concentraciones intracelulares

necesarias para causar muerte, pero sin que existan evidencias de que tales fármacos son expulsados activamente de ellas. La resistencia puede deberse entonces a una **reducción en la entrada de los fármacos en la célula**. Éste es el caso de fármacos hidrofílicos que necesitan de un transportador más o menos específico para entrar en las células, o bien de agentes que entran por endocitosis mediada por receptor. Cuando el transportador o receptor correspondiente muta, su especificidad se altera y los fármacos no pueden acceder al interior celular. Ejemplos de tales compuestos son el antifolato **metotrexato**, análogos de nucleótidos como el **5-fluorouracilo** y la **8-azaguanina**, o el **cisplatino** (Shen D et al., 1998).

En aquellos casos de multirresistencia en los que la

acumulación de fármacos en las células no cambia en absoluto, la razón del fenómeno la encontramos en una **activación de los sistemas de reparación de daños en el ADN (NER: "nucleotide excision repair". Chaney SG y Sancar A, 1996; MMR: "mismatch repair proteins". Fink D et al., 1998)**, o de **proteínas detoxificantes**. El **glutati6n** (GSH) es un poderoso antioxidante que inhibe el estrés oxidativo causante de da1os en el ADN y ARN. Adem1as, la conjugaci6n de GSH con f1rmacos, catalizada por la familia de **glutati6n-S-transferasas**, inactiva compuestos como los f1rmacos de platino (cisplatino, carboplatino y oxiplatino) y los complejos resultantes pueden ser expulsados fuera de las c1lulas por prote1nas ABC como la **MRP1** (multidrug resistance protein 1, o ABCC1) (Ishikawa T y Ali-Osman F, 1993). La activaci6n de **citocromo P450 oxidasas** (Nebert DW y Russell DW, 2002) tambi1n figura entre el arsenal de mecanismos de defensa con que cuentan algunas c1lulas tumorales para inactivar f1rmacos.

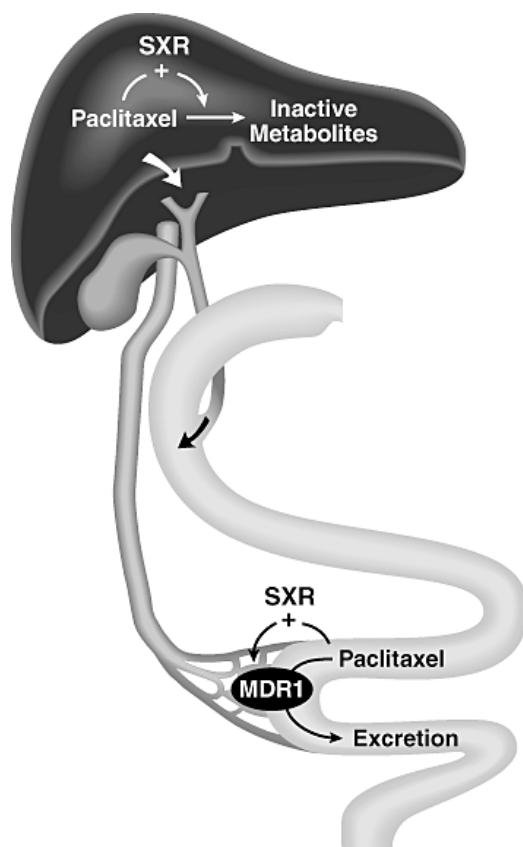


Figura 5: SXR regula coordinadamente el metabolismo de f1rmacos y su excreci6n.

Se ha comprobado que este sistema de enzimas detoxificantes en particular puede inducirse tras la exposici6n de las c1lulas a casi cualquier f1rmaco (Luo G et al. 2004). Y es m1s, la inducci6n de tales sistemas detoxificantes parece coordinarse a su vez con la inducci6n de prote1nas de eflujo de f1rmacos como la **Glicoprote1na-P MDR1** (Pgp o ABCB1). Existen evidencias que sugieren que ciertos receptores nucleares como el **SXR** ("steroid and xenobiotic receptor") (Synold TW et al., 2001; **Figura 6**) podr1an regular esta respuesta global de protecci6n de las c1lulas a estr1s ambiental mediante la inducci6n coordinada de m1ltiples mecanismos de defensa (Xu C et al., 2005).

Otra forma de resistencia a fármacos puede resultar de **mutaciones de la diana celular** que la hacen insensible al efecto inhibitor de los fármacos, de **mutaciones de la proteína de membrana importadora de fármacos** (en los casos en los que el fármaco necesite de tal transportador para su internalización en las células), o bien de la **expresión de isoformas alternativas** de la misma diana que no son tan susceptibles de inhibición. Tales son los casos de la resistencia a CPT-11 por mutaciones de la *DNA topoisomerasa I* (Andoh T, et al. 1987), de la resistencia a metotrexato por mutación de su transportador específico de membrana *RFC-1* ("*reduced folate carrier 1*"; Brigle KE et al., 1995), o de la resistencia a paclitaxel y alcaloides Vinca como consecuencia de la expresión de isoformas alternativas de α -y β -*tubulinas* (Burkhart CA et al., 2001). También se han reportado resistencias a fármacos debidas a la **sobre-expresión y elevado índice de recambio de una diana celular** que, una vez dañada, puede ser rápidamente reemplazada por moléculas intactas de nueva síntesis. Como ejemplo, citaremos la resistencia a 5-fluorouracilo debida a la sobre-expresión de su diana celular, la *timidilato sintasa* (Johnston PG et al., 1995). Más llamativo aún es el caso de resistencia debida a una sensible **disminución de la expresión de una diana** de cuya función pueda prescindirse, o bien compensarse de algún modo. De esta forma, sin diana que inhibir, el fármaco resulta inactivo, como es el caso de la resistencia al inhibidor de la *DNA topoisomerasa I* CPT-11/SN-38 (Jansen WJ et al. 1997), o de los inhibidores de la *DNA topoisomerasa II* doxorubicina y etopósido (Friche E et al., 1991). Finalmente, si los fármacos consiguen entrar en las células, no se pueden expulsar, no se logran inactivar, ni su diana reparar adecuadamente, entonces aún queda la posibilidad de que la célula tumoral, a pesar del daño sufrido, "decida" no morir (Igney FH y Krammer PH, 2002; Kaufmann SH y Vaux DL, 2003).

Es un hecho que puede resultar sorprendente, pero **los fármacos anticancerosos clásicos no matan células per sé, sino que inducen muerte celular por apoptosis** (Kim R, 2005) **o por otros mecanismos** (Brown JM y Attardi LD, 2005), causando en ellas suficientes daños a escala molecular como para desplazar el equilibrio entre las señales de supervivencia y las de muerte en favor de éstas últimas... **siempre y cuando la maquinaria de muerte celular todavía**

funcione correctamente. Esta maquinaria de apoptosis depende de la regulación por múltiples señales intra- y extracelulares, de la amplificación de éstas señales por segundos mensajeros, y de la activación de los efectores últimos de la apoptosis, las caspasas (Zimmerman KC et al., 2001). Una maquinaria tan compleja, en la que participan tantas proteínas diferentes regulando múltiples pasos, no es sorprendente que pueda fallar en más de un punto en las células tumorales debido a la inestabilidad genotípica y variabilidad fenotípica que las caracteriza. **Los defectos en las rutas apoptóticas pueden resultar de la propia transformación tumoral;** por ejemplo, en cánceres con variantes mutadas o no funcionales de la proteína **p53** (Lowe SW et al., 1993). Alternativamente, las células pueden adquirir alteraciones en tales rutas de inducción de apoptosis durante el tratamiento con quimioterapia, tales como modificaciones de los niveles de ceramida (Liu YY et al., 2001) o cambios en la maquinaria del ciclo celular que activan “checkpoints” y evitan así la iniciación de la cascada apoptótica (Pietenpol JA y Stewart ZA, 2002).

Un principio importante que debe extraerse de los estudios sobre la resistencia a múltiples fármacos es que **las células cancerosas son genéticamente heterogéneas.** Aunque el proceso que resulta en un crecimiento celular incontrolado del cáncer favorece la expansión clonal, las células de un tumor que son expuestas a la quimioterapia serán seleccionadas por su capacidad para sobrevivir y crecer en presencia de tales fármacos citotóxicos. Es muy probable que tales células tumorales sean genéticamente heterogéneas debido al **fenotipo mutador** típico del cáncer. Por lo tanto, en cualquier población de células tumorales expuesta a la quimioterapia **puede existir simultáneamente más de un mecanismo de MDR.** A éste fenómeno se le conoce como **resistencia multifactorial a múltiples fármacos** y, debido a él, parece claro que ninguna estrategia única orientada a la reversión del fenómeno de resistencias podrá aisladamente solventar éste problema clínico, del mismo modo que ningún tratamiento único podrá erradicar, una vez resuelto el problema de la MDR, todos los tipos de cáncer humano.

Los problemas pleiotrópicos exigen para su solución respuestas múltiples combinadas para cada una de las faceta del problema. Pero antes de tal abordaje, hay que conocer todas esas facetas. Hay que decir que no todos los posibles mecanismos moleculares que contribuyen a la MDR en cáncer han recibido la misma atención ni han sido objeto de estudio con el mismo ahínco. De todos ellos, quizá el mejor estudiado ha sido la **MDR clásica debida a la sobre-expresión de transportadores ABC** (Gottesman MM et al., 2001). Lo que se sabe de ellos y de su implicación en MDR será el objeto del siguiente apartado.

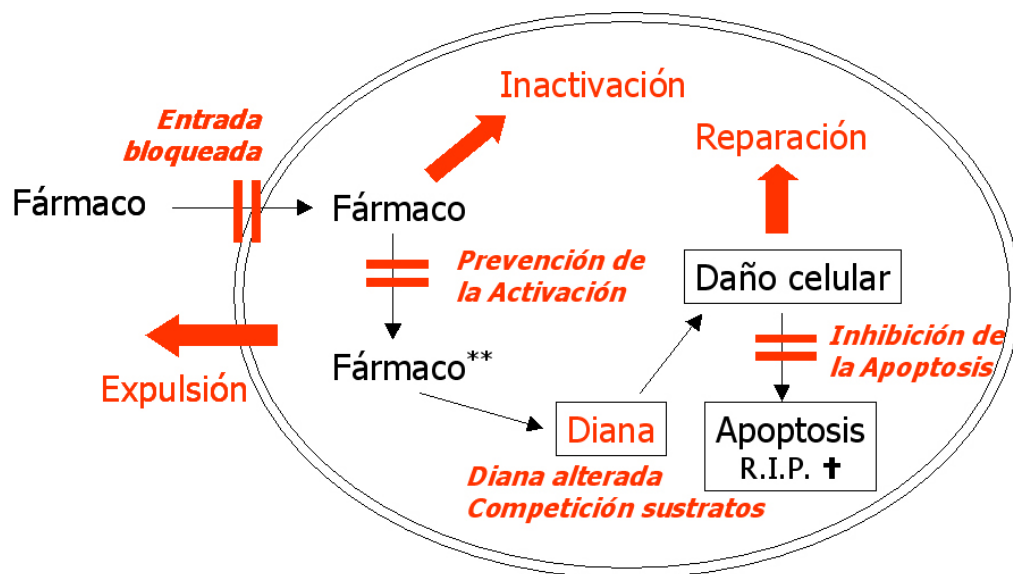


Figura 6: Algunos de los mecanismos de resistencia a fármacos en células tumorales. El fármaco, para actuar, debe entrar en la célula, en ocasiones ser activado, unirse a su blanco de acción y provocar daños celulares que disparen las cascadas de muerte celular por apoptosis. La inhibición de alguno de estos pasos, o el aumento de los mecanismos de reparación del daño producido, puede generar resistencia a fármacos.

III. TRANSPORTADORES ABC DE MÚLTIPLES FÁRMACOS

III.1. Transportadores MDR

Uno de los mecanismos MDR más importantes en la naturaleza es la expresión en membranas celulares de **transportadores de fármacos** que extruyen compuestos antimicrobianos y agentes antitumorales fuera de las células. Aunque algunos transportadores son más o menos específicos para un fármaco o clase de fármacos, los llamados transportadores MDR median el transporte unidireccional de un amplísimo espectro de compuestos a través de las membranas biológicas. Estos transportadores promueven fenotipos MDR tanto en microorganismos patógenos (Van Bambeke F et al., 2000) como en cánceres humanos (Gottesmann MM et al., 2002) mediante la expulsión de fármacos fuera de las células, lo que disminuye su concentración intracelular. Los transportadores MDR, sorprendentemente, se agrupan sólo en un **limitado número de familias** (Blackmore CG et al. 2001) que se han demostrado distribuidas prácticamente en todos los organismos que han sido estudiados. Basándose en la fuente de energía que emplean y la organización estructural de sus dominios, estos sistemas de transporte pueden dividirse en dos clases fundamentales de transportadores MDR (**Figura 7**): los **transportadores activos primarios**, que usan la **hidrólisis del ATP** como fuente de energía, y que representan la superfamilia de **transportadores ABC** (Higgins CF, 1992); y los **transportadores activos secundarios**, que acoplan el transporte de fármacos en contra de un gradiente de concentración a la **disipación de un gradiente de protones o de Na⁺, como un sistema de antiporte** (Paulsen IT et al., 1996). Miembros de esta clase de transportadores son la superfamilia **SMR** ("small MDR superfamily"), la superfamilia **MATE** ("multidrug and toxic compound extrusion"), la superfamilia **RND** ("resistance-nodulation-cell division"), y la superfamilia **MFS** ("major facilitator superfamily") (Putman M et al., 2000). Los transportadores ABC

son los principales ejecutores del transporte de fármacos en células eucariotas, incluido el ser humano, mientras que en organismos procariontas el grueso de tal función la desempeñan los transportadores activos secundarios (Van Bambeke F et al., 2000).

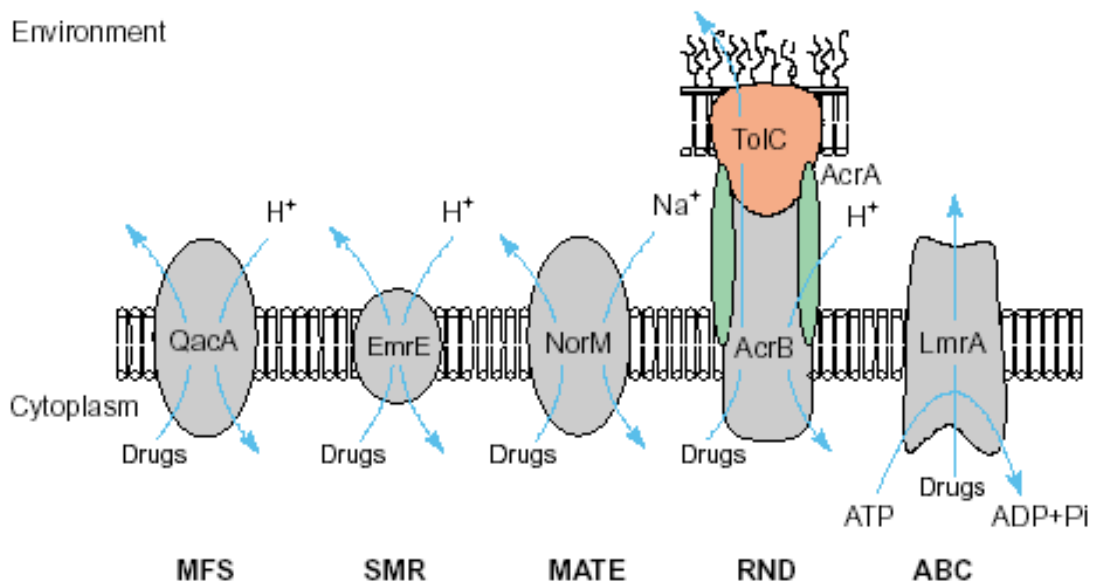


Figura 7: Miembros representativos de las 5 familias fundamentales de transportadores de múltiples fármacos descritas en la naturaleza hasta la fecha: **LmrA** de *Lactococcus lactis*; **QacA** de *Staphylococcus aureus*; **AcrB** y **EmrE** de *Escherichia coli*; **NorM** de *Vibrio parahaemolyticus*.

Recientemente se ha descubierto que unos y otros están compuestos por combinaciones de distintos módulos funcionales pertenecientes tanto a transportadores secundarios como a ABCs (**Figura 8**). Tal hallazgo sugiere que, durante la evolución de estos transportadores, la combinación de proteínas integrales de membrana con proteínas periplásmicas de unión de solutos (típicas de transportadores secundarios procariontas), o con una proteína ATPasa citosólica (posible ancestro de la F_1 ATPasa), o bien con ambas, ha resultado en las diferentes clases de transportadores que encontramos hoy día (Driessen AJM et al., 2000). Así pues, la asociación del transportador secundario original con una proteína de unión de solutos resultó en un transportador con una afinidad por su sustrato sustancialmente incrementada, mientras que la adquisición de un dominio citosólico

ATPasa acoplado al transportador transmembrana resultó en un tipo de transportador que no dependía ya del antiporte con protones o Na^+ , sino de la hidrólisis del ATP, lo que le proporcionaba un poder translocador incrementado, permitiendo así el transporte de solutos en contra de gradientes de concentración mucho mayores.

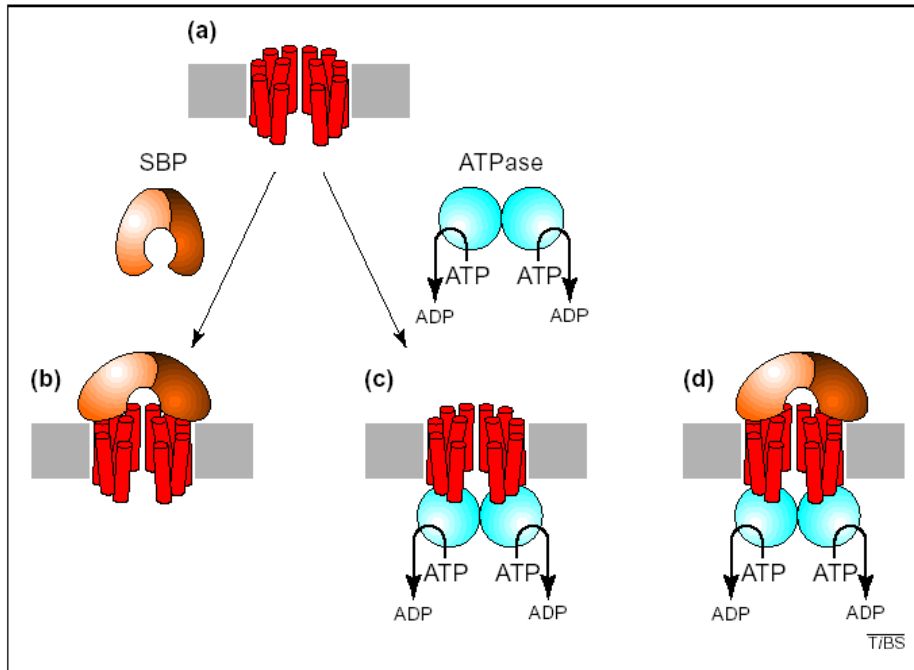


Figura 8: Modelo hipotético de la evolución de los sistemas de transporte, basado en sus similitudes estructurales: el ancestro de los transportadores secundarios **(a)** se asoció bien con una proteína soluble de unión de sustratos **(SBP)** para formar un transportador secundario dependiente de SBP **(b)**, o bien con una **ATPasa** para constituir un transportador dependiente de ATP **(c)**. Estos sistemas pudieron ser a su vez los ancestros de los actuales transportadores ABC dependientes de SPB **(d)** típicamente encontrados en bacterias como importadores de solutos.

Una prueba de que los transportadores ABC pudieron evolucionar a partir de un transportador secundario tras la adquisición de un dominio citosólico ATPasa viene del hecho de que al transportador ABC MDR **LmrA** de *Lactococcus lactis* (van Veen, HW et al., 1996), cuando se le elimina el dominio citosólico ATPasa, pasa a ser un transportador secundario y reversible de xenobióticos, dependiente de protones e independiente de la hidrólisis de ATP (Venter H et al., 2003).

III.2. Generalidades de los transportadores ABC

Los transportadores ABC **datan de hace más de 3.000 millones de años** en tiempo evolutivo, y se encuentran distribuidos en los 3 reinos de los seres vivos (Saier MH et al., 1998). Hasta la fecha hay descritos en la literatura alrededor de **1.100 de estos transportadores**, y casi 50 de ellos en el ser humano. Estas proteínas desempeñan funciones fisiológicas fundamentales relacionadas con el transporte de diferentes moléculas (iones inorgánicos, azúcares, vitaminas, lípidos, aminoácidos y péptidos, etc.) a través de membranas biológicas. Tales funciones incluyen la provisión de nutrientes esenciales para las células, la señalización de la presencia de agentes infecciosos, la construcción de paredes celulares, la homeostasis de membranas biológicas, la regulación del desarrollo en microorganismos y en mamíferos, y el correcto funcionamiento en el ser humano de tejidos tan diversos como el aparato digestivo, el hígado, los pulmones, la retina o el sistema inmunitario. Consecuentemente, diversas mutaciones en los genes que codifican para estos transportadores en el ser humano se han relacionado con varias enfermedades hereditarias, algunas muy graves. En concreto, se conocen por el momento **13 enfermedades genéticas que resultan de defectos en 14 transportadores ABC humanos**. Las más comunes de ellas son la fibrosis quística, la enfermedad de Stargardt, la adrenoleucodistrofia, la enfermedad de Tangier, el síndrome de Dubin-Johnson y la colestasis familiar intrahepática progresiva (Gottesman MM y Ambudkar SV, 2001). Además, tanto en bacterias Gram⁺ como en hongos, protozoos parásitos y células tumorales, esta superfamilia de proteínas transportadoras tiene una relevancia fundamental en el fenómeno de resistencia a fármacos (Lage H, 2003), pues la actividad de transportadores ABC de múltiples fármacos representa una estrategia biológica básica de defensa de las células vivas frente al ataque citotóxico de toxinas y xenobióticos, limitando la entrada de tales sustancias al interior de las células.

Los **transportadores ABC** deben distinguirse de las "**proteínas ABC**". Ambos tipos de proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio citosólico altamente conservado de unos 215 aminoácidos aproximadamente, que constituye el **dominio**

ABC o **dominio de unión a nucleótidos** (**NBD**: nucleotide-binding domain; **Figura 9**). Este dominio es una ATPasa extraordinariamente conservada, con un 30% o más de identidad global entre las diferentes proteínas ABC (Higgins CF, 1992), reconocible por la presencia de dos cortos motivos peptídicos, el **Walker A**

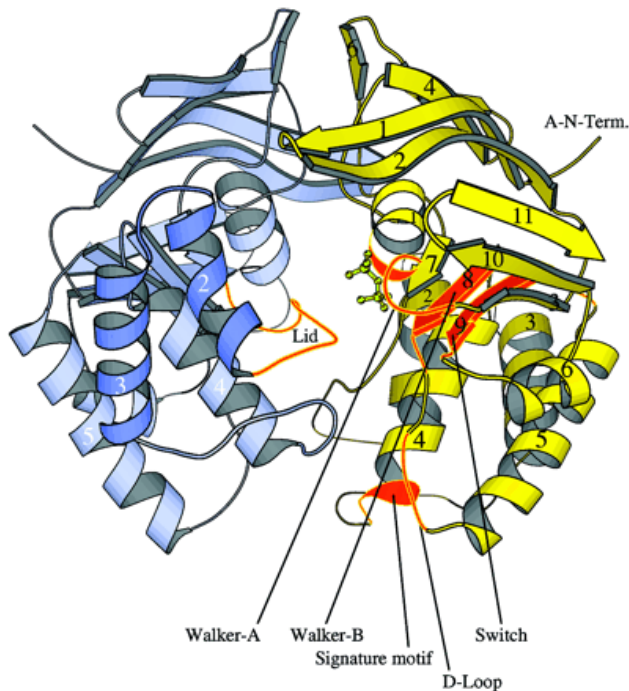


Figura 9: modelo de la estructura tridimensional de la proteína **MalK** (en la figura formando un homodímero), un típico dominio ABC de unión a nucleótidos, que forma parte del transportador de maltosa de *E.coli*.

rico en glicinas (GXXGXGKT/S), y el motivo hidrofóbico **Walker B** (secuencia consenso "hhhhDE" seguida por "DEA/PTSALD" o similar) (Walker JE et al., 1982). Ambos están implicados en la unión e hidrólisis del ATP, y se encuentran presentes en todas las proteínas que unen nucleótidos. Aguas arriba del motivo Walker B existe un tercer motivo consenso, exclusivo de esta superfamilia de proteínas: la "**secuencia sello o firma ABC**", de unos 15 residuos de longitud, que típicamente comienza con "LSGGQ" y que es absolutamente diagnóstica de estas ATPasas.

Las proteínas que contienen *dominios ABC* acoplan la energía de enlace del fosfato- γ liberada en la hidrólisis del ATP a muchos procesos celulares que no se restringen necesariamente a funciones de transporte, aunque tales sean las más representadas entre los miembros de la superfamilia. Por ejemplo, algunas parecen formar parte de canales iónicos regulados, como son los casos de las proteínas **CFTR** ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"; Anderson MP et al., 1991) y **SUR** ("sulfonylurea receptor"; Lorenz E et al., 1998). Otras emplean dominios ABC para acoplar la energía del ATP a procesos tan diversos como la reparación del ADN (proteína **mutS**; Obmolova G et al., 2000) o la síntesis de proteínas (**factor de**

elongación-3; Belfiedl GP et al., 1995). Sin embargo, los *transportadores ABC* propiamente dichos son aquellas proteínas que, además de poseer dominios ABC, tales dominios se asocian a **dominios transmembrana** hidrofóbicos (**TMD**: transmembrane domains), normalmente compuestos por 6 α -hélices transmembrana (**Figura 10**). Así, mientras los **NBDs podrían ser considerados como el motor de estos transportadores**, los **TMD serían los responsables de determinar la especificidad de sustrato del transportador y de formar el "canal" que permite el paso de sustratos a través de la membrana**.

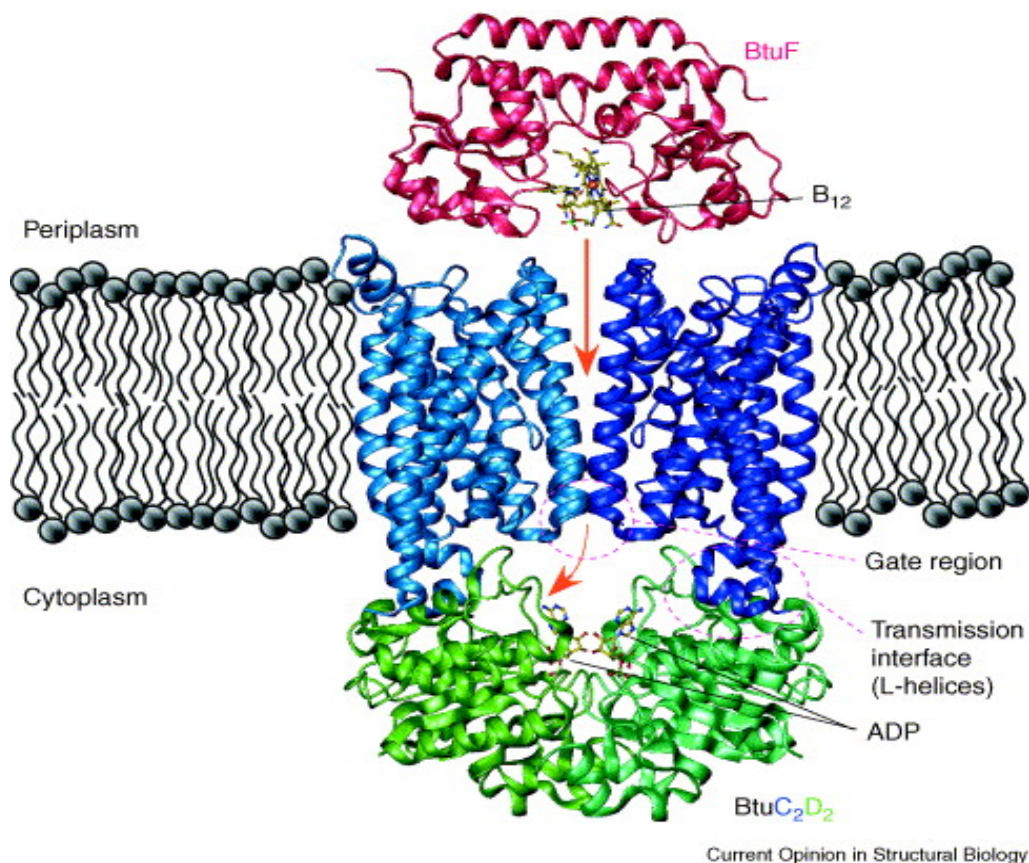
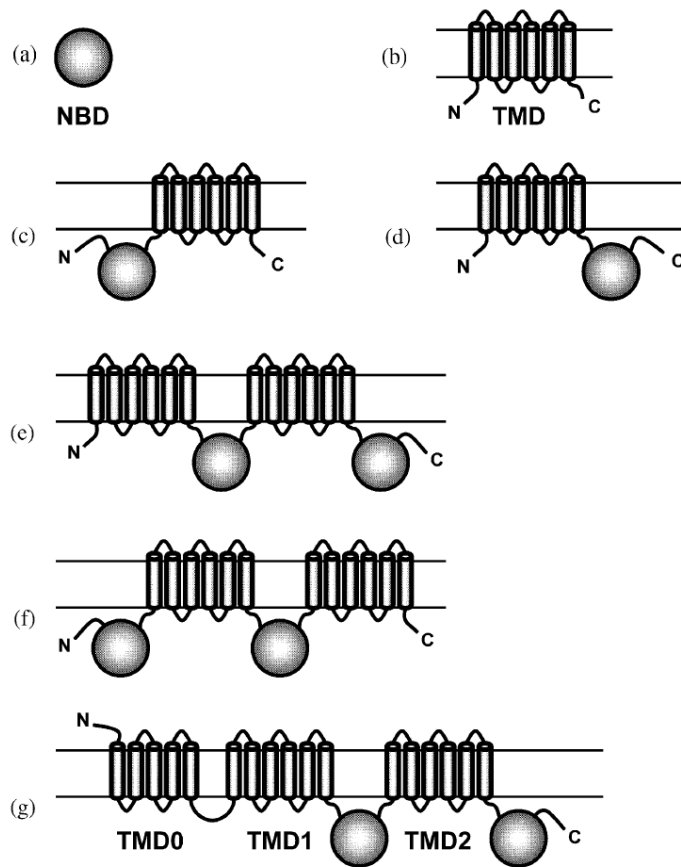


Figura 10: Modelo de la estructura tridimensional del **transportador BtuCD** de *E. coli*, que funciona como importador de vitamina B₁₂. En la figura se aprecian los dos NBDs (BtuD, en verde) orientados hacia el citoplasma, y asociados por la cara citosólica de la membrana a los dos TMDs (BtuC, en azul), que forman el canal que permite el transporte de sustratos a través de la membrana. Este transportador en particular cuenta con una proteína periplásmica accesoria de unión de sustratos (BtuF, en magenta).

Una característica resaltable de los transportadores ABC es la de que el movimiento de solutos acoplado al proceso de hidrólisis de ATP puede ser tanto hacia fuera (exportación o secreción) como hacia dentro de la célula (importación), habiendo transportadores especializados en hacer una cosa o la otra, pero no ambas. Por ejemplo, la mayoría de sistemas ABC procariontes suelen ser clásicos importadores necesarios para la captación de solutos de pequeño tamaño como monosacáridos, aminoácidos y vitaminas (Linton KJ y Higgins CF, 1998). Por su parte, las proteínas ABC exportadoras son clásicas, aunque no exclusivas, de organismos eucariotas donde, en cambio, no se ha descrito ningún ABC importador.



Los requerimientos estructurales mínimos de un transportador ABC biológicamente activo son **dos TMDs** y **dos NBDs** ($[\text{TMD-NBD}]_2$ o $[\text{NBD-TMD}]_2$) (Holland IB y Blight MA, 1999) (**Figura 11**). En eucariotas, esta organización estructural en cuatro dominios funcionales suele estar contenida en una única cadena polipeptídica, o bien cada mitad simétrica del transportador (hemitransportadores, o "**half-transporters**") se expresa por separado ($[\text{TMD-NBD}]$ o $[\text{NBD-}$

Figura 11: modelos de organización de los dominios de las principales clases de transportadores ABC. (a) Dominio de unión a nucleótido. (b) Dominio transmembrana. (c) Configuración $[\text{NBD-TMD}]$, e.g. BCRP humano (ABCG2). (d) Configuración $[\text{TMD-NBD}]_2$, e.g. LmrA de *Lactococcus lactis* o TAP1 humano (ABCB2). (e) Configuración $[\text{TMD-NBD}]_2$, e.g. MDR1 humana (ABCB1). (f) Configuración $[\text{NBD-TMD}]_2$, e.g. Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*. (g) Configuración $[\text{TMD}_0(\text{TMD-NBD})_2]$, e.g. MRP1 humano (ABCC1).

TMD]) y luego se unen para formar el transportador funcional. En procariontes, en cambio, el transportador ABC funcional suele resultar de la asociación de dominios sintetizados cada uno como una proteína separada del resto. En tal caso, cada proteína está codificada por un único gen, y los 4 genes para los 4 dominios estructurales se encuentran bajo el control transcripcional de un único promotor, formando un operón. Aunque sea la fundamental, no es ésta, sin embargo, la única forma de organización posible de los transportadores ABC en procariontes, pues se han descrito también otras diversas maneras de organización de los dominios estructurales para constituir un transportador activo, entre las que, como en eucariotes, también se conocen ejemplos de "half-transporters" como el antes mencionado **LmrA** de *Lactococcus lactis*, o el transportador del lípido A **MsbA** (Zhou Z et al., 1998) de *E. coli*.

III.3. Transportadores ABC que confieren MDR en el ser humano

Al menos 3 subfamilias de transportadores ABC (ABCB, ABCC y ABCG; <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>) poseen miembros capaces de conferir fenotipo MDR a las células que los expresan en sus membranas celulares (Litman T et al., 2001). El fenotipo MDR de células tumorales fue originalmente descrito por Keld Dano (Dano K, 1972), consecuencia del eflujo activo de antraciclinas y alcaloides de la Vinca en ascitos Ehrlich murinos, y asociado con la sobre-expresión de una glicoproteína de membrana de 170 KDa, la **Glicoproteína-P** (Pgp, "P" de permeabilidad) (Juliano RL y Ling V, 1976). La **Pgp MDR1** (codificada por el gen **ABCB1** de la subfamilia ABCB) fue **la primera proteína ABC humana conocida**, y también **el primer transportador ABC implicado en MDR en cáncer**, pero no era el único. En 1992 se describió el segundo transportador ABC relacionado con tal fenómeno: la proteína asociada con multirresistencia a fármacos (**MRP1**: MDR-associated protein 1), de 190 Kda y codificada por el gen **ABCC1** (Cole SPC et al., 1992). Con sólo un 15% de homología de secuencia con la Pgp, MRP1 se relaciona más estrechamente con la proteína **CFTR** (codificada por el gen **ABCC7**), razón por

la que se la agrupa en una subfamilia diferente a la de la Pgp (la subfamilia ABCC). El aislamiento de este transportador ABC facilitó el descubrimiento de otros 8 genes de la misma subfamilia ABCC, de los que al menos cuatro: **MRP2** (conocida originalmente como **cMOAT**: canalicular multispecific organic anion transporter), **MRP3**, **MRP4** y **MRP5** (codificadas por los genes ABCC3, 4 y 5, respectivamente) están relacionados potencialmente con resistencia a fármacos (Evers R et al., 1998; Kool M et al., 1997).

En 1998 se descubrió y clonó casi simultáneamente en tres laboratorios diferentes el gen del transportador ABC relacionado más recientemente con fenotipo MDR en cáncer: la proteína **BCRP** (breast cancer resistance protein), también llamada **MXR** ("mitoxantrone resistance"), codificada por el gen **ABCG2** (Doyle LA et al., 1998). De estas siete proteínas, **cuatro parecen claramente desempeñar una función bien definida en la protección frente a xenobióticos de los tejidos sanos del organismo**, afectando la absorción, biodistribución y excreción de tales compuestos (Leslie EM et al., 2005). Sin embargo su implicación clínica en el fenotipo MDR de cánceres humanos, por el momento, sólo parece clara para el caso de **Pgp** (Leonard GD et al., 2003).

La **expresión de MRP1 en el organismo humano es ubicua**, con niveles elevados en pulmones, testículos, riñones, músculo esquelético y células sanguíneas mononucleares periféricas (Flens MJ et al., 1996). En la mayoría de estos tejidos, **MRP1 se localiza en la membrana celular basolateral (Figura 12)**, lo que en algunos de ellos resulta en el eflujo de sus sustratos directamente a la sangre. Por su parte, las proteínas **MRP2**, **BCRP** y **Pgp tienen una distribución tisular más limitada** que la de MRP1, y **se localizan en la membrana apical de células epiteliales (Figura 12)**, sobre todo en santuarios farmacológicos tales como la barrera hematoencefálica, ovarios, testículos y placenta, en los que la protección de los tejidos del efecto de xenobióticos es fundamental (Fromm MF et al., 2004; Haimeur A et al. 2004; Sarkadi B et al., 2004).

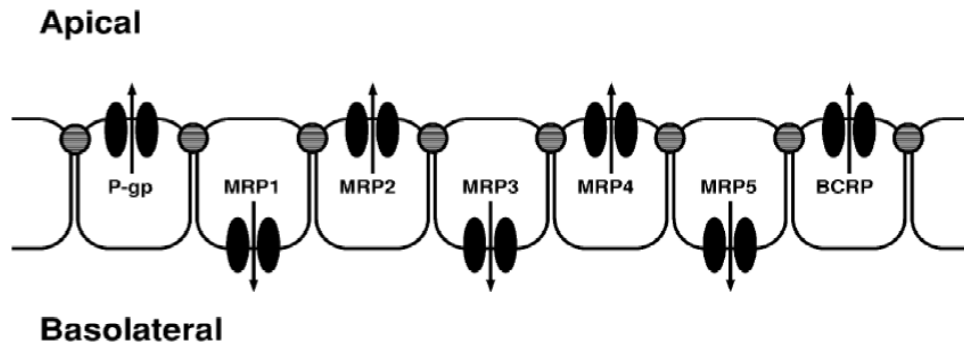


Figura 12: Localización subcelular de transportadores ABC de múltiples fármacos en epitelios polarizados.

También se expresan a relativamente altos niveles en el hígado, el lumen intestinal y los riñones, por lo que su función en la regulación de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de xenobióticos en estos tejidos parece más que clara.

III.4. Estructura secundaria y especificidad por fármacos anticancerosos

Como ya se mencionó antes, MRP1 y MRP2 pertenecen a la misma subfamilia y comparten entre sí un 49% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Por su parte, las proteínas Pgp y BCRP pertenecen a subfamilias diferentes de la superfamilia ABC y comparten una identidad de secuencia mucho menor (<20%) entre sí y entre ellas y la MRP1 o MRP2. Además, **Pgp tiene una estructura de 4 dominios de tipo [TMD-NBD-TMD-NBD] integrados en la misma cadena polipeptídica**, típica de la mayoría de transportadores ABC eucariotas (Loo TW y Clarke DD, 1999). En contraste, **BCRP es un "half-transporter" atípico**, consistente en un único TMD formado por 6 α -hélices precedido de un NBD [**NBD-TMD**], que para ser funcional forma, según todas las evidencias bioquímicas, un homodímero (Kage K et al., 2002).

MRP1 y MRP2 son también transportadores ABC atípicos, pues **están compuestos por cinco dominios**: los cuatro típicos y un dominio N-terminal extra compuesto por 5 segmentos transmembrana y con el extremo N-terminal

extracitosólico [TMD-TMD-NBD-TMD-NBD] (Bakos E et al., 1996; Hipfner DR et al., 1997).

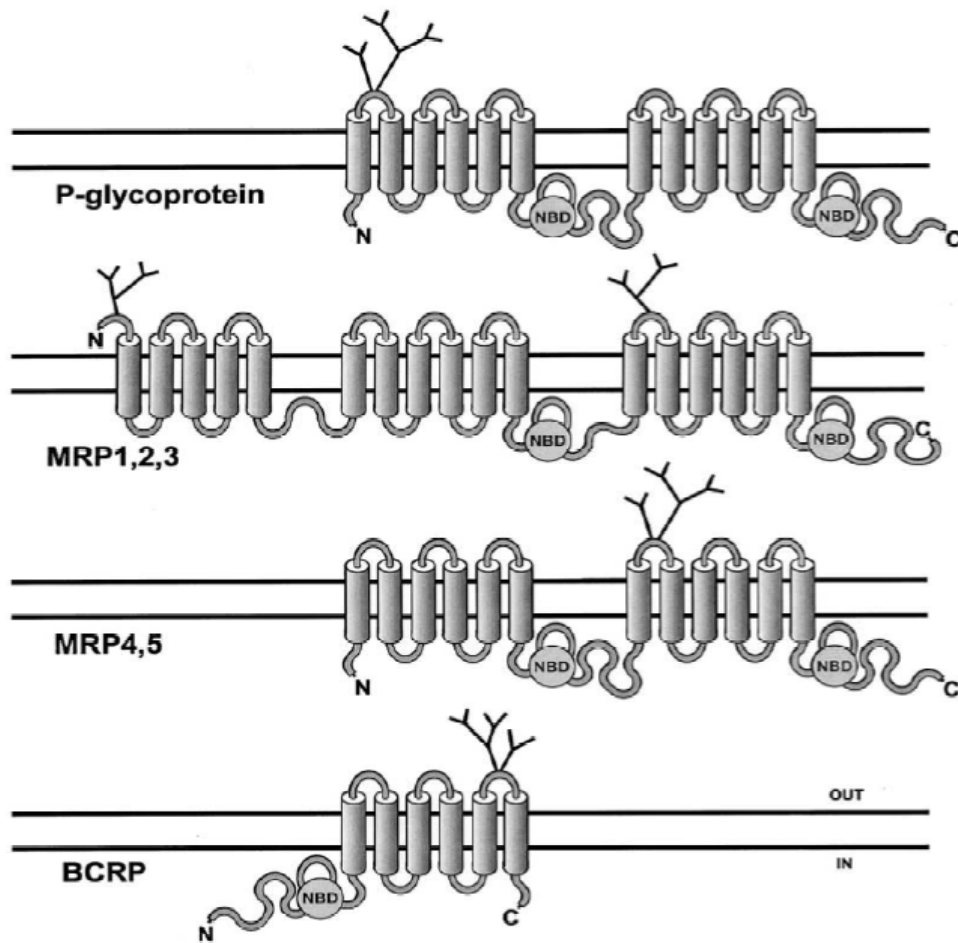


Figura 13: Estructuras secundarias de los transportadores humanos de múltiples fármacos que pertenecen a la superfamilia ABC.

A pesar de estas diferencias en la organización de los dominios, existe un **considerable solapamiento en el espectro de fármacos** frente a los que estas cuatro proteínas confieren resistencia en células tumorales (**Figura 14**). Así, **Pgp confiere altos niveles de resistencia frente a productos naturales voluminosos y anfipáticos, con cierta preferencia por cationes orgánicos que posean en su molécula de aminas terciarias**. El espectro de fármacos transportados por MRP1 y MRP2 es muy similar al de la Pgp (aunque con preferencia por aniones orgánicos); sin embargo, la forma en que Pgp y MRP1/MRP2 transforman fármacos es muy diferente. **Pgp es un transportador activo**

primario de fármacos, mientras que, aunque también ATP-dependientes, los transportadores **MRP1 y MRP2 expulsan fármacos fuera de las células mediante un mecanismo de cotransporte con glutatión (GSH)** (Renes J et al., 1999; Evers R et al., 2000). Una diferencia importante entre MRP1 y MRP2 en lo referente al espectro de compuestos que transportan es que la sobre-expresión de MRP2 está asociada con resistencia a cisplatino, pero no así la de MRP1 (Cui Y et al., 1999).

BCRP confiere resistencia a un rango más estrecho de compuestos anticancerosos que Pgp y MRP1/2 (Allen JD y Schinkel AH, 2002). Se conocen **tres variantes de BCRP** con una aminoácidos diferente en la posición 482 (Sarkadi B et al., 2004) , que afecta al espectro de compuestos frente al que la proteína es capaz de conferir resistencia. La variante que tiene Arg482 ha sido considerada la versión salvaje del transportador, mientras que las otras dos variantes, con Gly o Thr en lugar de Arg, se consideran versiones mutantes de la anterior. Sólo las versiones mutantes son capaces de conferir altos niveles de resistencia a antraciclinas, mientras que el topotecan es mejor sustrato para la forma salvaje de BCRP (Nakanishi T et al., 2003; Robey RW et al., 2003). **Al igual que Pgp, BCRP no depende de glutatión para el transporte de fármacos anticancerosos.**

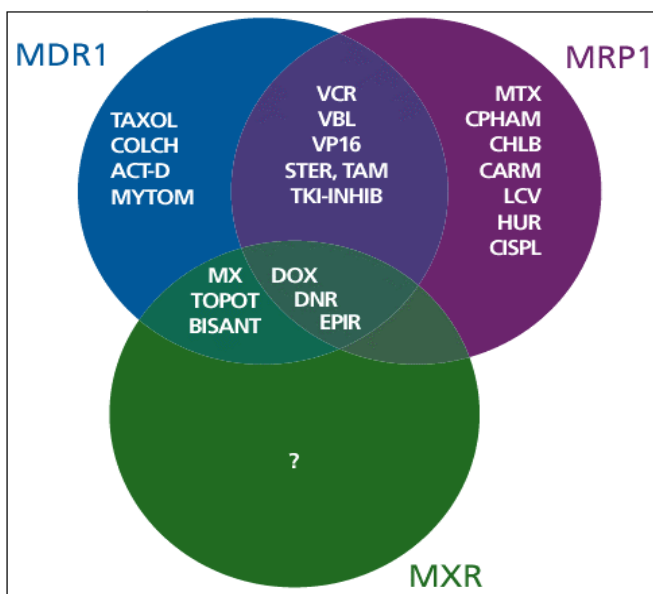


Figura 14: Espectro de sustratos de los transportadores ABC humanos de múltiples fármacos. **COLCH:** colchicina; **ACT-D:** actinomicina D; **MYTOM:** mitomicina; **VCR:** vincristina; **VBL:** vinblastina; **VP16:** etopósido; **STER:** esteroides; **TAM:** tamoxifeno; **TKI-INHB:** inhibidores de Tirosin-kinasas; **MTX:** metotrexato; **CPHAM:** ciclofosfamida; **CHLB:** clorambucil; **CARM:** carmustina; **LCV:** leucovorina; **HUR:** hidroxiurea; **CISPL:** cisplatino; **MX:** mitoxantrona; **TOPOT:** topotecan; **BISANT:** bisantreno; **DOX:** doxorubicina y adriamicina; **DNR:** daunorubicina; **EPIR:** epirubicina

Además de a fármacos de origen natural, BCRP y algunos transportadores tipo MRP también confieren resistencia al antimetabolito del folato **metotrexato**. El metotrexato es internalizado en las células por el *transportador de folatos reducidos*, y luego es glutamilado por la *folilpoli- γ -glutamato sintetasa* para formar poliglutamatos de metotrexato. MRPs confieren resistencia a metotrexato sólo en cortas exposiciones de las células al fármaco, antes de que éste sea poliglutamilado en el citoplasma, pero no así BCRP, que sí es capaz de transportar formas poliglutamiladas de metotrexato. Todas estas evidencias sugieren que **tanto BCRP como MRPs deben colaborar en la homeostasis celular del ácido fólico** (Hooijberg JH et al., 2004; Ifergan I et al., 2004).

IV. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE LOS TRANSPORTADORES ABC

IV.1. Estructura 3D

La completa comprensión del mecanismo por el que los transportadores ABC son capaces de reconocer múltiples fármacos y transportarlos a través de la membrana celular requiere la elucidación de su estructura tridimensional. Pero la **crystalización de transportadores ABC** para resolver su estructura por difracción de rayos X ha resultado ser una **tarea más que complicada**. Sin embargo, se han conseguido algunos avances en la obtención de **información estructural de baja resolución** sobre las proteínas humanas Pgp (Lee JY et al., 2002) y MRP1 (Rosenberg MF et al., 2001), y la YvcC de *Bacillus subtilis* (Chami M et al., 2003) mediante estudios de **microscopía electrónica de partícula única y cristales 2-D**. Para la Pgp, estos estudios revelan un anillo proteico hexagonal de aproximadamente $91 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$, con un poro central asimétrico de $30 \text{ \AA} \times 5\text{-}10 \text{ \AA}$.

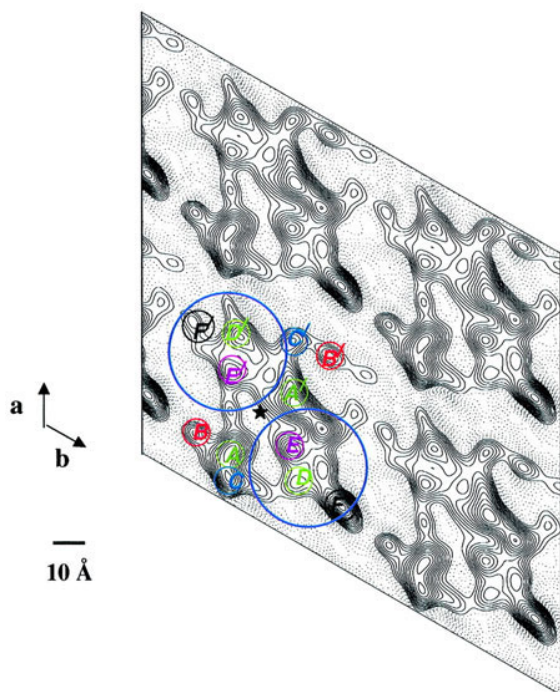


Figura 15: mapas de proyección de Pgp determinados mediante criomicroscopía electrónica sobre cristales 2-D a 10 \AA de resolución. La orientación del plano es equivalente a ver la proteína desde la superficie extracelular de la membrana plasmática. Las 12 densidades principales (marcadas como A-F y A'-F') serían las α -hélices transmembrana que constituyen los TMDs, y en cuyo centro dejan abierto un amplio canal acuoso. Los círculos azules marcan áreas correspondientes a extremos opuestos de la proteína, cuyas densidades globales marcarían las posiciones respectivas de los NBDs, orientados hacia el otro lado del plano (esto es, hacia la cara citosólica).

En esta estructura son aparentes 12 regiones de alta densidad, presumiblemente α -hélices (**Figura 15**). Para determinar la organización espacial de los dominios de la Pgp, se calculó a partir de los cristales 2-D un mapa 3-D de densidades con una resolución de $\sim 25 \text{ \AA}$ (**Figura 16**). Tal mapa reveló que el mencionado anillo proteico está compuesto por dos dominios, cada uno de los cuales formado a su vez por tres regiones electrodensas que presumiblemente se corresponden con agrupaciones apareadas de las 6 α -hélices transmembrana que forman cada TMD.

Estos dominios forman un canal abierto hacia la cara extracelular de la membrana, pero cerrado hacia su cara intracelular. Curiosamente, existen aberturas entre éstos dominios formadores del canal transmembrana que se abren a la propia matriz de la membrana celular, y que permitirían el acceso de fármacos al interior del canal desde la membrana celular. Hay, además, otros dos dominios, localizados cada uno justo debajo de cada putativo TMD, que forman sendos lóbulos de unos 30 \AA de

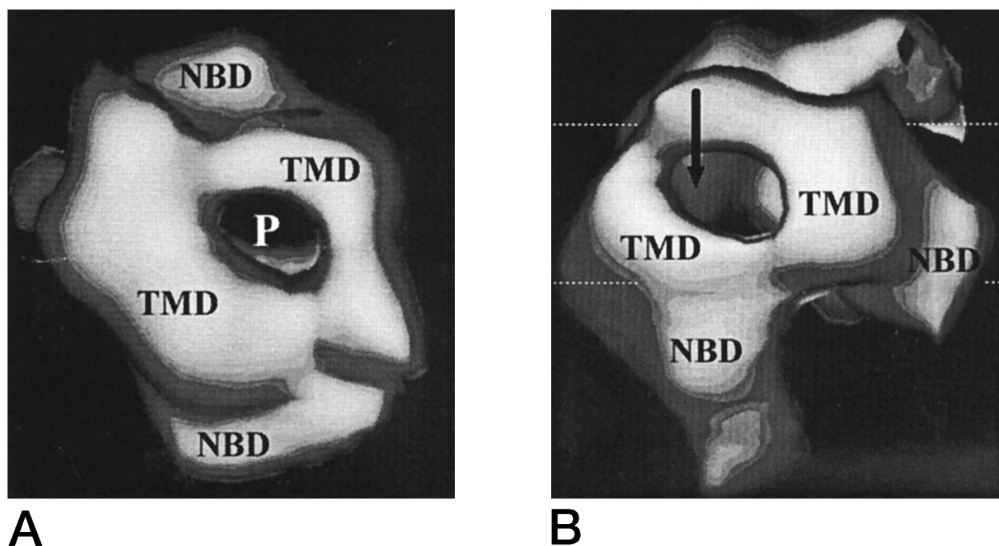


Figura 16: reconstrucción 3D de Pgp a partir de los mapas bidimensionales de densidades electrónicas de la **Figura 19**. **P** es el poro acuoso abierto a la cara extracelular de la membrana plasmática. **TMD** corresponderían con los dominios transmembrana, y **NBD** serían sendos dominios de unión a nucleótidos que, como lóbulos de 3 nm , se proyectarían de la estructura hacia la cara citosólica de la membrana. **A)** vista perpendicular a la cara extracelular de la bicapa lipídica. **B)** Vista lateral de Pgp, con la posición aproximada de la bicapa marcada por dos líneas horizontales. La flecha marca claramente la apertura (hay dos simétricas a cada lado de la molécula) en los TMD que permitirían el acceso de sustratos a la cámara acuosa directamente desde la fase lipídica de la membrana. La barra de escala representa $1,7 \text{ nm}$.

diámetro, y que podrían ser los NBDs de la Pgp. Hallazgos similares con las proteínas MRP1 y TAP (Velarde G et al., 2001), con estructuras anulares de ~ 100 Å de diámetro, sugieren que los transportadores ABC poseen todas estructuras 3-D muy similares.

Pero el avance fundamental en la comprensión de la estructura y mecanismo de los transportadores ABC se ha producido con la cristalización y determinación de la estructura de la proteína **MsbA** a 4.5 Å (Chang G y Roth CB, 2001; **Figura 21**), que proporcionó resolución del esqueleto de $C\alpha$, y de **BtuCD** a 3.2 Å (Locher KP et al., 2002; **Figura 10 y 18**), que proporcionó resolución a escala atómica.

MsbA es un "half-transporter", consistente en NBD y TMD únicos, que dimeriza para catalizar el transporte de lípidos, particularmente del lípido A, desde la cara interna a la cara externa de la membrana citoplasmática de *E.coli*, *V.cholera* y *S.typhimurium* (Doerrler WT y Raetz CR, 2002).

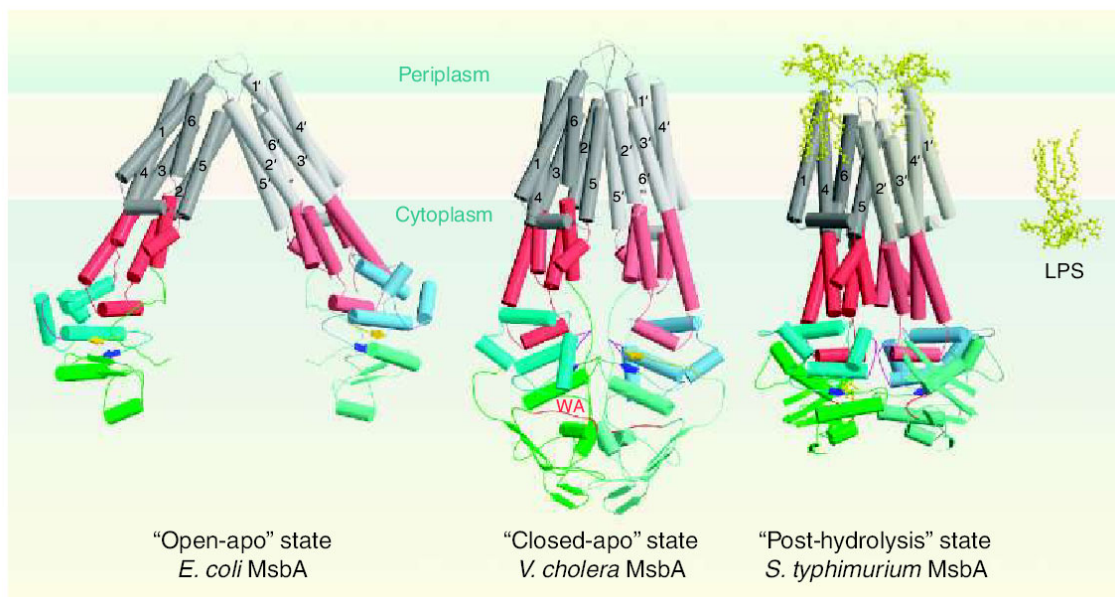


Figura 17: Estructura de **MsbA**, transportador del lípido A, tal y como se resolvió a partir de 3 fuentes biológicas distintas: *E.coli*, *V.cholera* y *S.typhimurium*, representando supuestamente 3 estados conformacionales diferentes del ciclo catalítico de la proteína. Más recientemente se ha sugerido que la "conformación abierta" de MsbA obtenida de *E.coli* es una estructura demasiado abierta para reflejar un estado fisiológico real de la proteína nativa, por lo que debe ser el resultado de un artefacto de la cristalización (ver texto para más detalles).

Su estructura cristalográfica revela un homodímero con forma cónica y dimensiones de $120 \text{ \AA} \times 115 \text{ \AA} \times 64 \text{ \AA}$, y confirma que los TMDs están compuestos cada uno por 6 α -hélices, formando entre ambos un ángulo de $30\text{-}40^\circ$ de tal forma que contactan en el lado extracelular de la membrana. Debido a esto, los NBDs aparecen separados $\sim 50 \text{ \AA}$ en la base del cono. El canal cónico formado por los TMDs es de diámetro suficiente para permitir la entrada del lípido A, lo que demuestra que, en efecto, forman la vía de translocación de sustratos a través de la membrana. Además, los NBDs se orientan efectivamente en la cara citosólica de la membrana celular.

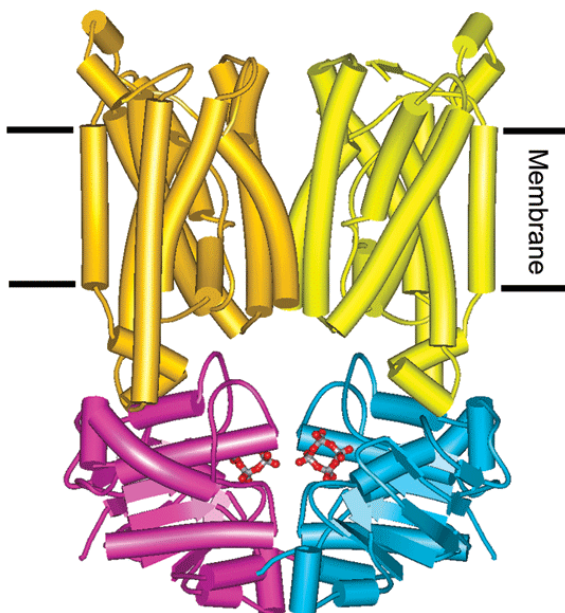
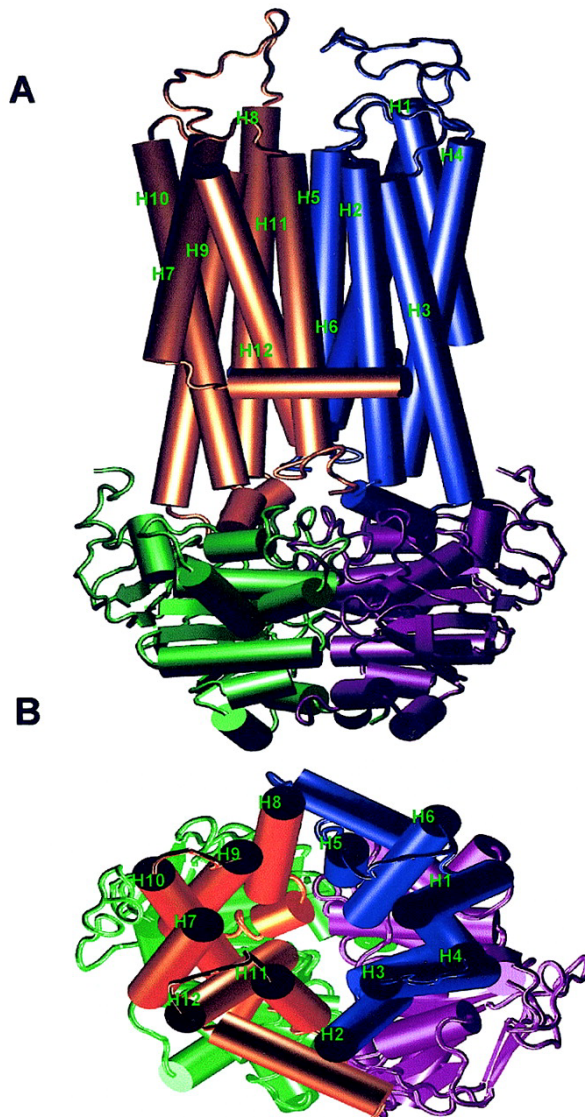


Figura 18: Estructura de **BtuCD**, transportador de vitamina B₁₂ de E.coli. Hasta la fecha, es el transportador ABC completo cuyo estructura cristalina se ha conseguido resolver a mayor resolución.

En muchos aspectos, la estructura de **BtuCD** contrasta con la de MsbA. Por ejemplo, las dimensiones del complejo BtuCD son más reducidas, de $90 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, y cada TMD se compone de 10 α -hélices empaquetadas de una forma más intrincada. Y lo más importante, los NBDs se localizan directamente enfrentados y muy próximos el uno al otro, con los motivos de unión de ATP yuxtapuestos (**Figura 10 y 18**).

Un problema que plantea esta divergencia de estructuras es el de cómo reconciliar el hecho de que los NBDs aparezcan tan distantes el uno del otro en la estructura de MsbA, cuando todas las pruebas bioquímicas y biofísicas en la Pgp (Loo TW y Clarke DM, 2000; Qu Q y Sharom FJ, 2001), y las estructuras cristalográficas de numerosos dominios ATPasa de otros transportadores ABC bacterianos (HisP, MalK, RbsA, etc.) (Higgins CF y Linton KJ, 2004) demuestran que, para la hidrólisis

efectiva del ATP, ambos dominios deben interactuar físicamente. Esto ha dado lugar a la hipótesis de que **la estructura de MsbA (Figura 17)**, por un lado, **y las de Pgp (Figura 19) y BtuCD (Figura 10 y 18)**, por otro, **serían, respectivamente, como instantáneas de las conformaciones abierta y**



Y Figura 19: Modelo de la estructura de la Glicoproteína-P humana generado por homología de secuencia y usando como molde estructural los datos cristalográficos disponibles del transportador homólogo MsbA, además de otros datos estructurales concernientes a la asociación dimérica de los NBDs de Pgp. **A)** vista lateral; **B)** vista perpendicular a la cara extracelular de la membrana

cerrada de estos transportadores ABC durante el ciclo de hidrólisis del ATP y transporte de sustratos. En cualquier caso, posteriores estudios estructurales más detallados parecen sugerir que aunque los transportadores ABC, en efecto, experimentan grandes cambios conformacionales durante el ciclo de transporte (Rosenberg MF et al., 2001; Rosenberg MF et al., 2003), y que la divergencia en las mencionadas estructuras cristalinas podría ser reflejo de situaciones conformacionales diferentes, **la excesivamente abierta estructura cónica de MsbA podría no ser más que un artefacto de la cristalización** (Davidson AL y Chen Jue, 2005), siendo las estructuras de baja y alta resolución, respectivamente, de Pgp

BtuCD, más fieles el estado biológico real que deben presentar los transportadores ABC *in vivo*.

La **arquitectura de los transportadores ABC es muy diferente de la de otros transportadores ATP-dependientes**

como las *ATPasas tipo P* (bombas de Ca^{2+}) o la *ATPasa F_1-F_0* , en las que las α -hélices transmembrana están empaquetadas más compactamente y los NBDs se distancian más de la membrana hacia el citosol.

Aunque los TMDs de diferentes subfamilias de transportadores ABC comparten *grosso modo* la misma arquitectura general, pueden tener distinto número de α -hélices transmembrana y compartir escasa similitud de secuencias. De hecho, las dos estructuras de TMDs a alta resolución de que se dispone hasta la fecha (las BtuD y MsbA; Locher KP et al., 2002; Chang G y Roth CB, 2001) están plegadas cada una de una forma que no puede ser modelizada usando la estructura de la otra. Aunque todos los NBDs comparten un origen evolutivo y un mecanismo comunes, parece que, a lo largo de la evolución, se han acoplado a diferentes subfamilias de TMDs para formar los distintos transportadores ABC conocidos. Dada la diversidad de sustratos con la que trabaja esta superfamilia de transportadores, no es descabellado anticipar diferencias mecánicas entre distintas subfamilias de TMDs.

IV.2. Mecanismo de transporte

El modelo del **mecanismo del ciclo de actividad ATPasa** de los transportadores ABC asume, básicamente, una **alternancia catalítica de los dos NBDs** durante la hidrólisis del ATP. Los dos sitios de unión de ATP, cada uno en un NBD, son fundamentales para la funcionalidad del transportador y para que tenga lugar el ciclo efectivo de hidrólisis del ATP, pero **ambos sitios no hidrolizan ATP a la vez sino que se turnan**, hidrolizando alternativamente uno y luego el otro (*Modelo de sitios catalíticos alternantes*: Senior A et al., 1995). Este modelo generalmente asumía que la principal fuente de energía para el transporte de sustratos procedía del evento de hidrólisis mismo del ATP y que los dos NBDs, al operar alternativamente, podían ser acoplados a distintas etapas del ciclo de transporte. Sin embargo, una serie de datos recientes han venido a plantear la posibilidad de que **el arriba mencionado modelo deba ser revisado**. Los datos bioquímicos sugieren que **es la unión del ATP al NBD, más que su hidrólisis, lo que causa los cambios conformacionales en el transportador para**

promover el transporte de sustratos. Además, los datos estructurales revelan que los dos bolsillos de unión de ATP se enfrentan el uno al otro formando la interfase del dímero NBD-NBD, lo que implica que los dos NBDs deben actuar concertadamente en un único paso en lugar de influir cada uno diferentes etapas del ciclo de transporte.

Modelo del "Interruptor de ATP" (ATP-switch)

Este modelo (**Figura 20**), el más reciente, y resultante de agrupar toda la información bioquímica, biofísica y estructural de que se dispone acerca de varios transportadores ABC (entre ellos la Pgp humana), implica **comunicaciones repetidas y en ambas direcciones entre los NBDs y los TMDs del transportador.** A diferencia de las ATPasas tipo P, **en los transportadores ABC no existe forma intermediaria de la proteína fosforilada covalentemente,** pues la comunicación supone solamente cambios conformacionales no covalentes.

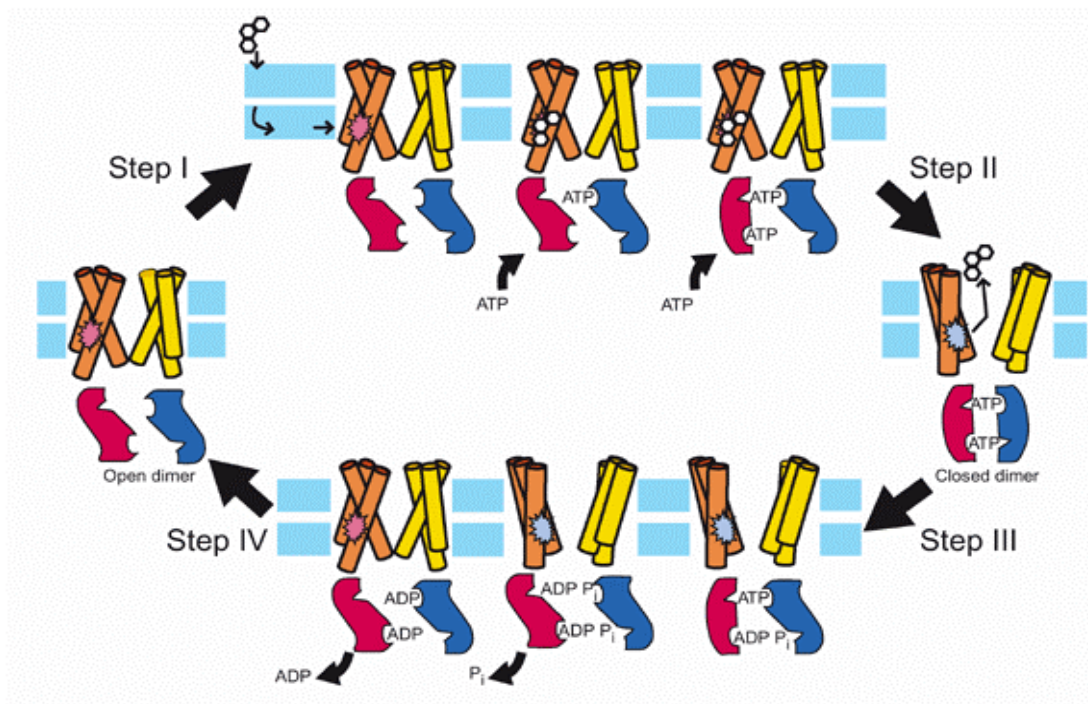


Figura 20: Modelo de "interruptor de ATP" para el ciclo catalítico de un transportador ABC. Los TMD aparecen representados como cilindros que atraviesan la membrana. Los NBDs se representan, por claridad, como figuras vistas perpendicularmente al plano de la membrana (volteadas 90° respecto de los TMDs).

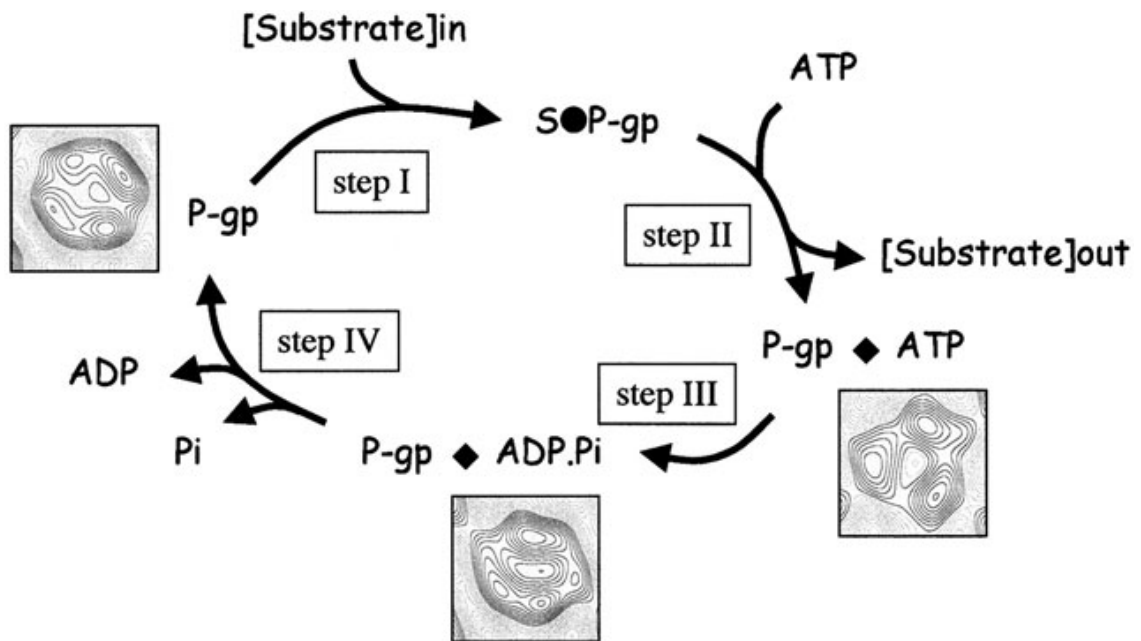


Figura 21: Cambios conformacionales que sufre la Glicoproteína-P humana durante el ciclo catalítico de hidrólisis de ATP y transporte de sustratos. Las imágenes son mapas de proyección de Pgp determinados mediante criomicroscopía electrónica sobre cristales 2-D a 10 Å de resolución.

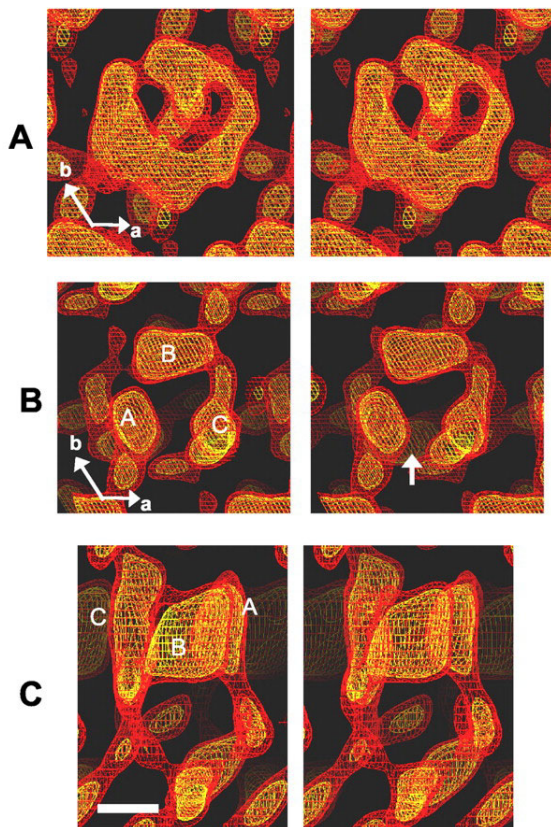


Figura 22: estructura cristalografica de Pgp a una resolución de 2,2 Å en la que se observan los cambios conformacionales de los TMD tras la unión de nucleótidos a los NBDs del transportador. **A)** vista de Pgp perpendicular al plano de la membrana desde la cara extracelular. **B)** punto de vista similar al anterior pero con la proteína uniendo nucleótidos. La flecha blanca marca la posición de una de las dos aberturas laterales que abren el canal central a la matriz de la membrana, y que permitirían el acceso de sustratos. **C)** vista lateral de la proteína uniendo nucleótidos. La barra de escala son 2,2 nm

El corazón del modelo se basa en el **cambio alternante o “switch” entre dos conformaciones principales de los NBDs**: la formación de un **dímero cerrado NBD-NBD** tras la unión de 2 moléculas de ATP en la interfase del mismo; y la disociación en un **dímero abierto** tras la hidrólisis del ATP y liberación de P_i y ADP. La cinética de este cambio alternante se ve incrementada por la **cooperatividad entre los sitios de unión de ATP**, y puede ser finamente regulada por señales procedentes de los TMDs. Ese cambio entre las conformaciones abierta y cerrada de los dímeros induce cambios conformacionales en los TMDs (**Figura 21 y 22**) necesarios para el transporte vectorial de los sustratos a través de la membrana.

Así, el ciclo global de hidrólisis de ATP y transporte de sustratos para un exportador típico como la Pgp humana funcionaría de la siguiente manera:

i. La unión de sustratos a los TMDs facilita la formación del dímero cerrado:

La unión del sustrato transportable al sitio(s) de unión de fármacos en los TMDs inicia el ciclo de transporte, transmitiendo un cambio conformacional a los NBDs, lo que **incrementa su afinidad por el ATP** y disminuye la energía de activación para la formación del dímero cerrado. Los cambios conformacionales entre ambos dominios (TMDs y NBDs) se transmiten muy probablemente a través de la interacción de los llamados **bucles L** (con secuencia EAA) de los TMDs (Mourez M et al., 1997) con los **bucles Q** (Smith PC et al., 2002; Dalmas O et al., 2005) y otras regiones estructurales diversas (Schmitt L et al., 2003) de los NBDs, las cuales se encuentran muy próximas unas a otras.

ii. La unión del ATP induce la formación del dímero cerrado:

Contra todo pronóstico, parece claro, a la luz de todas las evidencias recopiladas, que en el caso de los transportadores ABC **es la unión del ATP y no su hidrólisis lo que induce en el transportador la cadena de cambios conformacionales en los TMDs necesarios para el transporte activo de sustratos a través de la membrana celular**. La unión de las dos moléculas de ATP a los bolsillos de unión de cada NBD es cooperativa (Hrycyna CA et al., 1999), y puesto que dicha

unión involucra a residuos de ambos NBDs, como consecuencia de ella los dominios quedan enfrentados y asociados en una conformación estrechamente cerrada. Los cambios conformacionales que se transmiten a su vez desde este dímero cerrado hasta los TMDs provocan que **el sitio de unión de fármacos pierda afinidad por el sustrato** previamente unido en la etapa I. Se sospecha que en esta fase con los NBDs asociados por las dos moléculas de ATP es cuando **el sustrato sale del transportador** y es efectivamente transportado a través de la membrana.

iii. El ATP se hidroliza:

En esta etapa el transportador se encuentra todavía en un estado activado, lo que sugiere que tras la hidrólisis del ATP el dímero cerrado de NBDs todavía no ha recuperado su conformación abierta (Urbatsch IL et al., 2003), y el sitio de unión de fármacos en los TMDs aún presenta una afinidad por los sustratos baja (Ramachandra M et al., 1998). Por lo tanto, la hidrólisis del enlace γ -fosfato del ATP no es suficiente por sí misma para restaurar el transportador a su configuración basal original. **El estímulo que dispara la hidrólisis se desconoce.** Puede ser un proceso autocatalítico, consecuencia directa de la geometría del ATP unido con relación a ciertos residuos hidrolíticos introducidos por la conformación cerrada de los NBDs. También es posible que la liberación del sustrato de los TMDs induzca algún cambio conformacional que se transmita a los NBDs y dispare la hidrólisis del ATP.

iv. Liberación de P_i y ADP:

Después de la hidrólisis del ATP, el **dímero de NBDs cerrado se desestabiliza** por repulsión electrostática entre el ADP coordinado con el motivo Walker A de un NBD y el P_i coordinado con el motivo sello del otro NBD (Smith PC et al., 2002). Esto provoca una rotación de los subdominios de cada NBD que permite la **liberación del ADP y P_i** , y con ello **se restaura la configuración abierta del dímero y la alta afinidad del sitio de unión de sustratos en los TMDs.**

IV.3. Energética y estequiometría del ciclo de transporte

Puesto que los transportadores ABC son verdaderos transportadores activos capaces de bombear sustratos en contra de elevados gradientes de concentración, necesitan una fuente de energía. A pesar de esto, se ha demostrado que el transportador **LmrA** puede funcionar como un facilitador pasivo en ausencia de NBDs, y que el transporte de fármacos por la proteína intacta puede revertirse con la consecuente síntesis de ATP cuando se impone un gradiente de concentración reverso de sustratos (Venter H et al., 2003; Balakrishnan L et al., 2004). Por lo tanto, **ni la unión del ATP ni su hidrólisis son necesarias para el transporte de sustratos en sí, pero confieren direccionalidad al proceso de transporte, ventajas cinéticas y proporcionan la energía requerida para promover el transporte de sustratos en contra de gradientes de concentración.**

En el modelo de interruptor de ATP expuesto más arriba se asume que, en el dímero cerrado de NBDs, ambos bolsillos de unión de nucleótidos tienen unido ATP. Se han observado **2 moléculas de ATP unidas en varias estructuras cristalográficas de dímeros** (MalK, Rad50, etc.), y se han detectado también bioquímicamente en la Pgp intacta (Qu Q et al., 2003). No es descabellado, sin embargo, imaginar una variación de este modelo en la que una sola molécula de ATP podría ser suficiente para estabilizar el dímero cerrado.

La situación con respecto a la hidrólisis del ATP es un poco menos clara. Para la mayoría de transportadores ABC, ambos bolsillos de unión de ATP son capaces de hidrolizar el nucleótido (Szabó K et al., 1998), lo que sugiere que **2 moléculas de ATP son necesarias por cada ciclo de transporte**. Sin embargo, la hidrólisis de una sola de las moléculas de ATP podría ser suficiente para desestabilizar el dímero cerrado, aunque a un ritmo más lento. Consistente con esto, se ha demostrado experimentalmente que **la hidrólisis del ATP por ambos NBDs no es esencial para el transporte**. Así, cuando se inactiva uno de los bolsillos de unión de nucleótido de Pgp mediante una mutación puntual que no impide la hidrólisis por parte del otro bolsillo, el transporte no se detiene (Tomblin G et al., 2003). Los resultados previos que parecían demostrar que mutaciones en cualquiera de los dos

NBDs inactivaban el transportador (Hrycyna CA et al., 1999) pueden explicarse porque tales mutaciones en un NBD también estaban inactivando al segundo NBD vía acoplamiento alostérico.

La interpretación de los papeles de los dos NBDs se ha complicado por los datos que demostraban que ambos dominios de algunos transportadores ABC hidrolizaban ATP de forma alternativa, incluida Pgp (Urbatsch IL et al., 2003). **Para Pgp, cada uno de los dos sitios de unión hidroliza ATP en proporciones equivalentes, sin que uno lo haga primero con preferencia al otro** (Hrycyna CA et al., 1999). Esto se puede interpretar de dos maneras: o bien la hidrólisis alternante de las dos moléculas de ATP sucede dentro del mismo ciclo de transporte y la elección de cual de los bolsillos hidroliza primero es aleatoria, o bien la hidrólisis alternante continúa entre un ciclo y el siguiente de manera que un bolsillo hidroliza primero en un ciclo y el otro bolsillo hidrolizará primero en el siguiente. Esto requeriría una "memoria" de lo que ocurrió en el ciclo de transporte anterior. Incluso en los transportadores en los que ambos NBDs son idénticos (HisP) se ha visto que existe cierta asimetría entre los dos NBDs durante el ciclo, lo que es consistente con una memoria entre ciclos. En contraste, los transportadores de la subfamilia ABCC como MRP1 tienen los dos NBDs claramente asimétricos, y es el NBD2 el que hidroliza ATP preferentemente (Nagata K et al., 2000). Cualquiera que sea el caso, **el resultado neto es el mismo para todos los transportadores ABC: hidrólisis del ATP, liberación del nucleótido y desestabilización del dímero cerrado.**

IV.4. Sitios de unión para sustratos

La especificidad de sustrato de los transportadores ABC, con la excepción de aquellos dependientes de proteínas periplásmicas de unión de sustratos - clásicos de los sistemas bacterianos de importación de solutos, se determina por **uno o más sitios de unión de sustratos localizados en los TMDs**. Algunos transportadores ABC translocan sólo una molécula de sustrato por ciclo, y poseen un único sitio de unión de sustratos. Otros, en cambio, poseen múltiples sitios de unión. Por ejemplo, algunos transportadores MRP parecen transportar tanto fármacos citotóxicos como

glutación (GSH), los cuales se unen a sitios diferentes (Loe DW et al., 1998). Como también transportan conjugados fármaco-GSH, **el número de sitios puede ser sólo una cuestión semántica**: un sitio para un conjugado fármaco-GSH llega a ser dos sitios cuando los ligandos no están conjugados. **Para Pgp, los estudios farmacológicos han identificado al menos tres sitios de unión de fármacos que interaccionan entre sí** y desde los cuales puede ocurrir transporte efectivo, y **un sitio adicional al que se unen moduladores** de la proteína no transportables (Shapiro AB y Ling V, 1997; Shapiro AB et al., 1999; Martin C et al., 1997; Martin C et al., 2000). Donde existen múltiples sitios de unión, frecuentemente ocurre que un sustrato estimula el transporte simultáneo de otro, bien a través de unión cooperativa (Martin C et al., 1997), o resultado de que la ocupación simultánea de más de un sitio de unión de fármacos estimula más eficientemente la unión de ATP y la formación del dímero NBD-NBD cerrado (Manciu L et al., 2003).

La **localización precisa de los sitios de unión de fármacos en los TMDs se desconoce** a pesar de todos los estudios de mutagénesis y de marcaje por fotoafinidad, y **ningún transportador ABC ha sido todavía cristalizado formando un complejo con alguno de sus sustratos**. Para los transportadores que translocan sustratos hidrofílicos, es muy probable que los sitios se encuentren en la cámara acuosa transmembrana formada por los TMDs. Sin embargo, para aquellos que transportan sustratos hidrofóbicos que interaccionan desde el interior de la hemimembrana interna (como Pgp y LmrA), las interacciones iniciales pueden implicar a α -hélices expuestas a las cadenas acílicas de los lípidos de la bicapa. De hecho, para el caso de Pgp, **los fármacos primero deben solubilizarse en la matriz de la membrana plasmática con mayor o menor eficiencia de acuerdo con su coeficiente de partición, y luego interactuar con el transportador desde la fase lipídica, al nivel de la cara citosólica de la membrana** (Bolhuis H et al., 1996; Shapiro AB y Ling V, 1997; Qu Q y Sharom FJ, 2002; Lugo MR y Sharom FJ, 2005), accediendo a los sitios de unión de sustratos en el interior de los TMDs a través de "puertas" definidas por las α -hélices transmembrana a ambos lados de los TMDs, y que permitirían el acceso directo de

los sustratos directamente desde la membrana plasmática (Loo TW y Clarke DM, 2005; **Figura 23**).

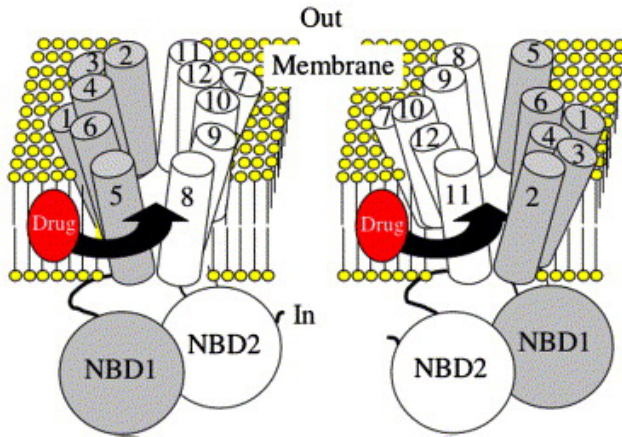


Figura 23: Acceso directo de los fármacos desde la membrana al interior del bolsillo de unión de sustratos de Pgp. Este acceso tiene lugar a través de las "puertas" definidas por las α -hélices transmembrana a un lado y otro del transportador.

Así, transportadores como la Pgp pueden ser vistos bien como "flipasas" (Higgins CF y Gottesman MM, 1992) que translocan fármacos hidrofóbicos desde la cara citosólica a la cara externa de la membrana, o bien como "aspiradoras hidrofóbicas" (Bolhuis H et al., 1996) que tomarían los fármacos que difunden de la cara interna de la membrana, y los expelerían directamente al medio acuoso extracelular.

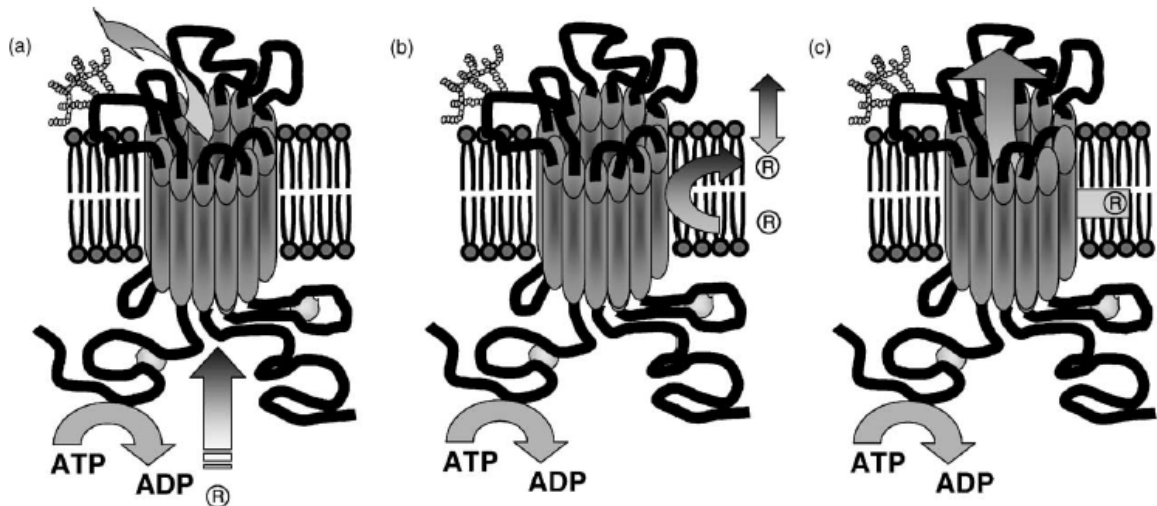


Figura 24: Modelos propuestos para explicar el mecanismo de expulsión de fármacos de Pgp: **a)** modelo de poro **b)** de "flipasa" y **c)** de "aspiradora hidrofóbica" de fármacos. Tomado de **Varma MVS et al., 2003**.

Varios grupos han intentado estimar la estequiometría del transporte de sustratos, esto es, el número de moléculas de sustrato transportado por molécula de ATP hidrolizado. Esto ha resultado ser técnicamente bastante complicado, pero todas las estimaciones dan entre **1 y 2 moléculas de soluto por molécula de ATP** (Shapiro AB y Ling V, 1998; Ambudkar SW et al., 1997). Parece posible que para algunos transportadores sean 2 las moléculas de ATP hidrolizadas por ciclo, mientras que otros sólo necesiten la hidrólisis de un ATP. De igual manera, como algunos transportadores poseen sólo un sitio de unión de compuestos, y otros poseen múltiples sitios que no siempre tienen que estar ocupados en su totalidad, pueden suceder estequiometrías variables dependiendo del transportador particular y de los sustratos estudiados.

V. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS TRANSPORTADORES ABC TIPO MDR EN EL SER HUMANO

Las proteínas Pgp MDR1, MRP1, MRP2 y BCRP/ABCG2 **son capaces, colectivamente, de transportar una vastísima variedad de compuestos tóxicos**, entre los que figuran carcinógenos, pesticidas, toxinas, fármacos, metales, metaloides y productos de peroxidación lipídica. Estos transportadores ABC, además, **se expresan en tejidos importantes para la absorción** (pulmones, intestino) y **metabolismo y excreción** (hígado, riñones) de tales sustancias, y forman también parte integral de **barreras funcionales que protegen a tejidos "santuario"** de sus efectos tóxicos (barreras hematoencefálica, sangre-fluido cerebroespinal, sangre-testículos y placenta). Por todo ello, estos transportadores ABC son cada vez más reconocidos por su capacidad para **modular la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de xenobióticos**.

Sin embargo, a pesar de que Pgp no trabaja sola sino coordinadamente con otros transportadores y enzimas detoxificantes (con las que incluso comparte patrones de expresión tisular), **para los propósitos prácticos de esta tesis consideraremos sólo las funciones fisiológicas concernientes a la proteína Pgp MDR1**, que es de largo el transportador ABC MDR mejor estudiado. Y entre tales funciones no sólo trataremos aquellas clásicamente relacionadas con la farmacología de xenobióticos, como se ha dicho más arriba, sino que, además, hablaremos también de otras funciones que han sido reconocidas sólo recientemente y que, aunque peor conocidas por el momento, no por ello son menos importantes para la relevancia fisiológica de Pgp en el ser humano.

<i>Common name</i>	<i>Systematic name</i>	<i>Tissue</i>	<i>Nonchemotherapy substrates</i>	<i>Chemotherapy substrates (known and suspected)</i>
ABCA2	ABCA2	Brain, monocytes	Steroid derivatives, lipids	Estramustine
P-gp/MDR1	ABCB1	Intestine, liver, kidney placenta, blood-brain barrier	Neutral and cationic organic compounds, many commonly used drugs	Doxorubicin, daunorubicin, vincristine, vinblastine, actinomycin-D, paclitaxel, docetaxel, etoposide, teniposide, bisantrene, homoharringtonine, Gleevec (STI-571)
MDR2	ABCB4	Liver	Phosphatidylcholine, some hydrophobic drugs	Paclitaxel, vinblastine
MRP1	ABCC1	All tissues	Glutathione and other conjugates, organic anions, leukotriene C4	Doxorubicin, epirubicin, etoposide, vincristine, methotrexate
MRP2, cMOAT	ABCC2	Liver, kidney, intestine	Similar to MRP1, nonbile-salt organic anions	Methotrexate, etoposide, doxorubicin, cisplatin, vincristine, mitoxantrone
MRP3	ABCC3	Pancreas, kidney, intestine, liver, adrenal glands	Glucuronate and glutathione conjugates, bile acids	Etoposide, teniposide, methotrexate, cisplatin, vincristine, doxorubicin
MRP4	ABCC4	Prostate, testis, ovary, intestine, pancreas, lung	Nucleoside analogues, organic anions	Methotrexate, thiopurines
MRP5	ABCC5	Most tissues	Nucleoside analogues, cyclic nucleotides, organic anions	6-Mercaptopurine, 6-thioguanine
MRP6	ABCC6	Liver, kidney	Anionic cyclic pentapeptide	Unknown
MRP7	ABCC10	Liver, heart, kidney	Glutathione conjugates, lipophilic anions	Unknown
MXR, BCRP, ABC-P	ABCG2	Placenta, intestine, breast, liver	Prazosin	Doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone, topotecan, SN-38
BSEP, SP-gp	ABCB11	Liver	Bile salts	Paclitaxel

Figura 25: Localización tisular y funciones fisiológicas de los transportadores ABC de fármacos

V.1. Funciones farmacológicas de Pgp

La proteína Pgp MDR1 está presente principalmente (aunque no exclusivamente) en las células epiteliales del organismo, donde se localiza en la membrana apical (Thiebaut F, 1987). En consecuencia, los sustratos transportados por Pgp se translocan desde la cara basolateral a la apical de los epitelios. Esto puede tener consecuencias dramáticas en el comportamiento farmacológico de muchas sustancias en el organismo. Muchos de estos aspectos farmacológicos fueron directamente puestos de manifiesto por vez primera en ratones KO para una o ambas de las dos proteínas murinas ortólogas de la Pgp humana: las Pgp *Mdr1a* y *Mdr1b* (Schinkel AH, 1997).

Pgp en la barrera hematoencefálica

Las células endoteliales de los pequeños capilares sanguíneos del cerebro están estrechamente asociadas unas a otras mediante uniones estrechas, cubriendo por entero la superficie interna de estos vasos sanguíneos. Como consecuencia, todos los compuestos que no sean lo suficientemente pequeños para difundir entre las células tienen que cruzar la célula endotelial para translocar desde la sangre hasta los tejidos cerebrales. Puesto que muchos sustratos de Pgp son bastante hidrofóbicos, en principio tienen la posibilidad de atravesar las membranas de las células endoteliales por simple difusión, y entrar así en el cerebro a un ritmo razonablemente alto.

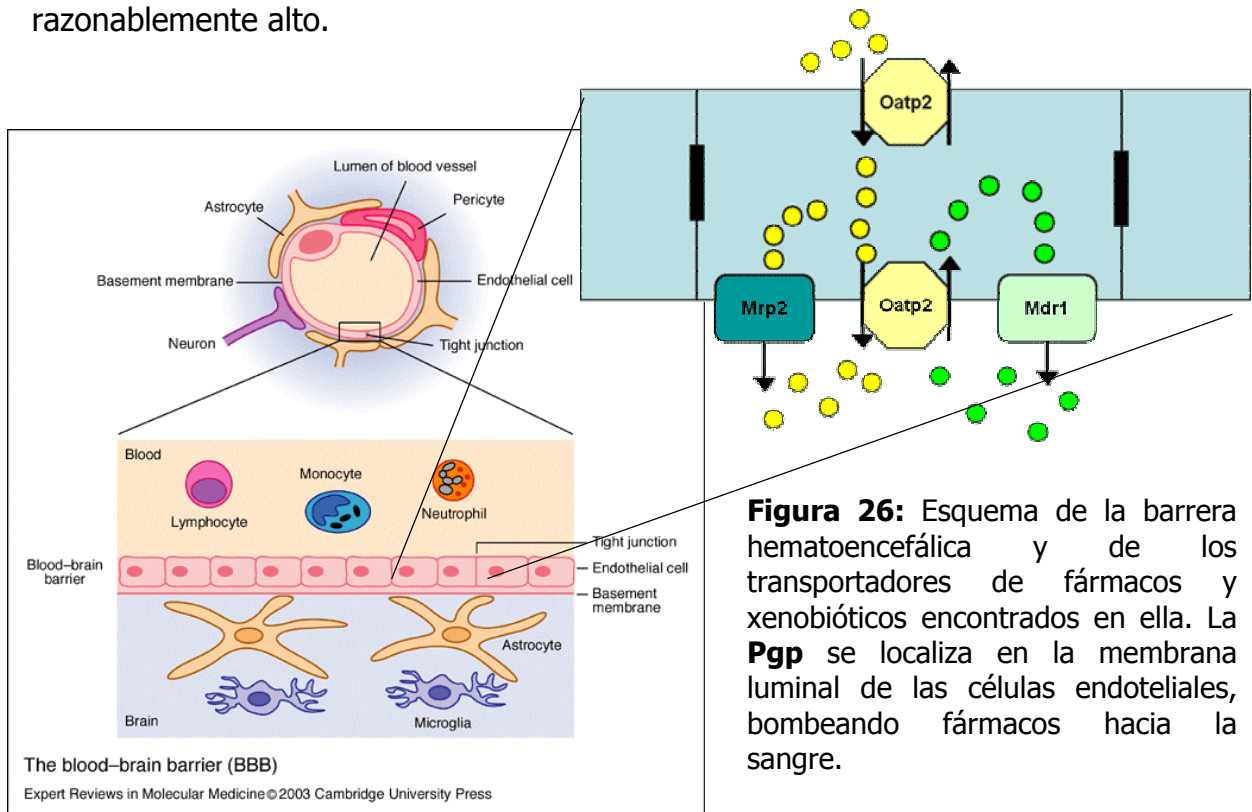


Figura 26: Esquema de la barrera hematoencefálica y de los transportadores de fármacos y xenobióticos encontrados en ella. La **Pgp** se localiza en la membrana luminal de las células endoteliales, bombeando fármacos hacia la sangre.

Sin embargo, debido a los **elevados niveles de expresión de Pgp en la membrana luminal (la que da al torrente sanguíneo) de las células endoteliales** (Cordon-Cardo C et al., 1989), los fármacos sustrato de esta proteína que entran en estas células desde la sangre son rápidamente bombeados de nuevo a ella. De este modo, **la penetración neta de sustratos de la Pgp desde la sangre hasta el tejido cerebral disminuye muchísimo**. En ausencia de

expresión de Pgp en la barrera hematoencefálica, la penetración cerebral de sustratos de Pgp se incrementa de 10 a 100 veces, dependiendo del sustrato, lo que tiene consecuencias importantes para la aplicabilidad clínica y toxicidades de muchos fármacos (Schinkel et al., 1996). El cerebro es un órgano crítico, y potencialmente muy sensible a los efectos tóxicos de toda clase de compuestos exógenos. Es bastante obvio que Pgp debe haber evolucionado en parte para proteger al cerebro de los efectos dañinos de las xenotoxinas que podemos ingerir con la comida, o quizá generadas por organismos patógenos en el intestino (Sun H et al., 2003).

Pgp en la barrera sangre-testículos y sangre-nervios

La función de Pgp en estas localizaciones tisulares es completamente análoga a la de la proteína en la barrera hematoencefálica: parte de la vasculatura capilar de estos tejidos ha desarrollado propiedades similares a la de la cerebral, incluyendo una elevada expresión de Pgp en sus células endoteliales. Así, la Pgp participa en la protección de tejidos potencialmente sensibles a la acción de xenobióticos, y de importancia crítica por su función fisiológica (Choo EF et al., 2000).

Pgp en la barrera placentaria

Pgp se expresa funcionalmente en los *sincitiotrofoblastos placentarios* (Lankas GR et al., 1998), donde se localiza también en la membrana apical, hacia el torrente sanguíneo materno (Sugawara I et al., 1988). Los sincitiotrofoblastos forman una barrera funcional entre las circulaciones sanguíneas de la madre y el feto, y son esenciales no sólo para el intercambio de nutrientes y productos de desecho, sino también para la protección

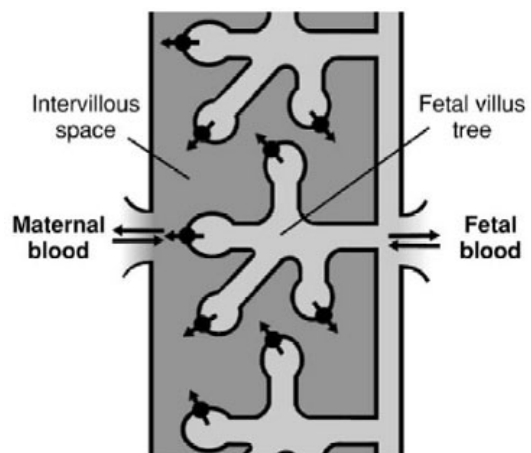


Figura 27: Localización de **Pgp** (bolitas negras) en los sincitiotrofoblastos de la placenta. Obsérvese el sentido de bombeo de xenobióticos (flechas) desde la sangre fetal a la materna.

del propio feto. La función de Pgp aquí vuelve a ser similar a la descrita en la barrera hematoencefálica: proteger al hipersensible feto en desarrollo del efecto nocivo de cualquier sustancia presente en la circulación de la madre, y también eliminar productos del propio catabolismo fetal, mediante bombeo activo de tales sustancias de vuelta al torrente sanguíneo materno (Smit JW et al., 1999). La penetración de sustratos de Pgp a través de la placenta en ratones KO para Mdr1a y Mdr1b se incrementa de 10 a 20 veces, lo que puede resultar en defectos congénitos de los fetos en desarrollo. Para la inmensa mayoría de los propósitos terapéuticos, una baja penetración de fármacos en el feto es algo más que deseable, pero para el caso del tratamiento del VIH podría ser ventajosa una penetración razonable de antiviricos justo antes del nacimiento, que es cuando el riesgo de transmisión del virus desde madres infectadas al feto es mayor.

Pgp en la función excretora hepatobiliar e intestinal

La proteína **Pgp MDR1 es muy abundante en la membrana apical de los hepatocitos**, que forman los canalículos biliares, y **también en la membrana luminal (microvellosidades) del intestino delgado y grueso** (Thiebaut F et al., 1987).

Dadas estas localizaciones tisulares, se predijo que Pgp desempeñaba en ellas una función de **extrusión de fármacos y otros compuestos desde los hepatocitos a la bilis, y desde el epitelio intestinal al lumen intestinal**. Puesto que muchos

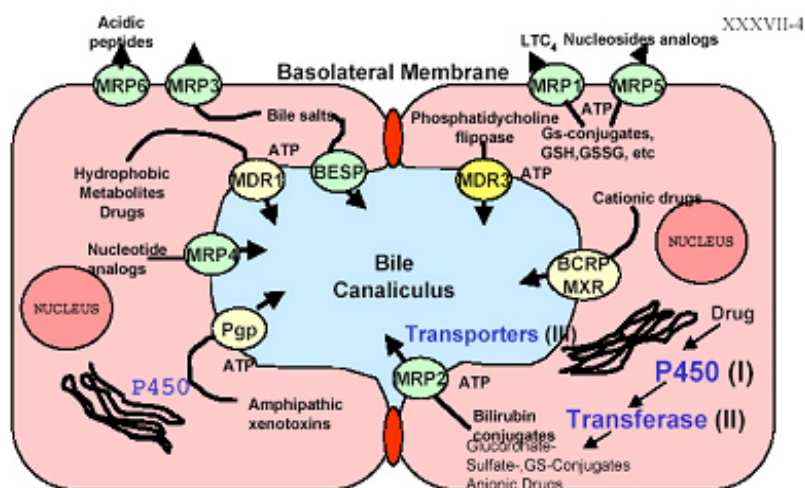


Figura 28: Enzimas detoxificantes y transportadores ABC de fármacos en los hepatocitos; entre ellos, la **Pgp**, donde bombea fármacos hacia los canalículos biliares.

compuestos pueden efectivamente penetrar desde el torrente sanguíneo a los hepatocitos y células del epitelio intestinal, esta extrusión realizada por Pgp resultaría en una **función neta de excreción**: los compuestos translocados así serían en última instancia eliminados del cuerpo con las heces, por lo que **globalmente se estaría produciendo un aclaramiento plasmático de xenobióticos y, por tanto, la detoxificación del organismo**.

Esta función predicha para Pgp ha sido directamente confirmada en experimentos con ratones KO para Pgps (Sparreboom A et al., 1997). Para muchos fármacos esto resultaba, tras administración intravenosa del compuesto, en un aclaramiento plasmático más rápido en presencia de Pgp funcional que en su ausencia.

Función de Pgp en la limitación de la biodisponibilidad oral de fármacos

Dada la abundante expresión intestinal de Pgp, una función potencial muy obvia de la proteína es la de **restringir el ritmo al que sus sustratos presentes en el lumen intestinal pueden atravesar el epitelio intestinal y entrar en el torrente sanguíneo**. Muchos fármacos son sustratos de Pgp, por lo que la biodisponibilidad oral de muchos de ellos puede ser limitada por Pgp. En efecto, de nuevo en modelos animales KO para Pgps se confirmó tal suposición, pues la absorción oral del fármaco anticanceroso paclitaxel era bastante mayor en estos animales que en los normales (Sparreboom A et al., 1997), y posteriormente otros grupos confirmaron lo mismo con otros diversos fármacos.

Para propósitos de farmacoterapia, la absorción oral de un compuesto puede ser un factor muy importante. **La administración oral de cualquier fármaco es preferible a otras formas porque es barata, relativamente segura, y mucho más sencilla y atractiva para los pacientes**. Sin embargo, si un fármaco dado tiene una pobre absorción oral, los niveles plasmáticos que se alcancen de tal compuesto pueden no ser suficientemente elevados como para tener efecto terapéutico alguno. También ocurre que una pobre absorción intestinal se relaciona también con una dosificación de fármaco muy variable de unos pacientes a otros, lo que puede ser un problema si el fármaco tiene una ventana terapéutica de

concentraciones muy estrecha. Por lo tanto, **la actividad de Pgp en el epitelio intestinal puede ser un problema fundamental para la aplicabilidad terapéutica de muchos fármacos** (Chan LMS et al., 2004). Por esta razón, es de gran interés para muchas compañías farmacéuticas el comprobar en una etapa muy temprana del desarrollo de cualquier fármaco si tal compuesto es o no un buen sustrato de Pgp, porque esto puede significar que no podrá administrarse oralmente, y dependiendo de las indicaciones terapéuticas del mismo, tal factor puede impedir el uso útil del fármaco desde un punto de vista clínico.

Un hecho intrigante, por las consecuencias que puede tener en lo referente a la función natural de Pgp, es que ratones KO deficientes en ***Pgp Mdr1a*** desarrollan frecuentemente en el laboratorio un tipo de inflamación del intestino grueso muy similar a la ***enfermedad inflamatoria intestinal*** y a la ***enfermedad de Crohn***, diagnosticadas cada vez más frecuentemente en el ser humano (Yang H et al., 2001). Esta inflamación intestinal se observó que dependía de la presencia de bacterias intestinales, y no parecía resultar de una respuesta inmune anormal. Aunque aún no se ha demostrado, parece probable que la inflamación resulta de la producción de toxinas por parte de las bacterias del intestino, que normalmente se mantienen confinadas al lumen intestinal por la actividad de Pgp Mdr1a. La ocurrencia variable de este fenómeno en los diferentes laboratorios que trabajan con la estirpe de ratones KO para Mdr1a depende probablemente de la presencia y abundancia en la flora intestinal de los ratones de cada laboratorio de ciertas cepas bacterianas productoras de enterotoxinas. En cualquier caso, el creciente número de evidencias sobre el papel esencial que Pgp desempeña en las interacciones hospedador-bacterias en el tracto gastrointestinal, así como en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, sugieren una **fuerte relación del gen *MDR1* humano con la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal y la progresión de tumores gastrointestinales** (Ho GT et al., 2003).

Función de Pgp en el riñón

Mientras que la función fisiológica de Pgp en los tejidos anteriormente comentados ha sido demostrada de manera muy convincente, **la situación de esta**

proteína en el riñón es menos clara. Pgp es abundante en la membrana apical (luminal) de los túbulos proximales (Figura 16), por lo que cabría esperar también una función excretora de Pgp aquí, **bombeando sustratos de la sangre a la orina**. Sin embargo, muchos estudios farmacológicos usando ratones KO para Pgps han ofrecido **resultados no concluyentes al respecto, e incluso contradictorios**. En algunos casos la ausencia de Pgp en ratones resultaba en un incremento de la excreción renal de fármacos, lo que parecería contradecir una supuesta función excretora de Pgp en riñón (Smit JW et al., 1998). Sin embargo, esto puede en parte tener que ver con un redireccionamiento general de las rutas excretoras para sustratos de Pgp en los ratones KO para esta proteína (un cambio de una excreción primariamente hepatobiliar/intestinal/fecal a una excreción fundamentalmente renal; Mayer U et al., 1996), o bien deberse a un cambio en la expresión de otros transportadores o enzimas relacionados con la eliminación de los fármacos testados. De hecho, se ha comprobado que ciertas enzimas metabolizantes de fármacos son sobre-expresadas en animales deficientes de Pgps, pero que tal sobre-expresión depende también de las condiciones en que los animales son mantenidos en el laboratorio (Schuetz EG et al., 2000). Aunque, visto lo anterior, la función excretora de Pgp en el riñón aún no se ha demostrado definitivamente, dadas las funciones que sí se sabe ya que Pgp realiza en otros tejidos en el resto del organismo, **parece difícil de imaginar qué otra cosa podría hacer Pgp en el riñón si no es contribuir a la excreción de, al menos, algunos tipos de compuestos**. De todas formas, la cuestión requiere aún más investigación.

V.2. Inhibición farmacológica de Pgp para optimizar la farmacoterapia

Dado el profundo impacto que la actividad de Pgp MDR1 tiene en toda una serie de importantes procesos farmacológicos y toxicológicos, se ha considerado con gran interés la **posibilidad de emplear alguno de los inhibidores de Pgp disponibles para intentar optimizar algunos aspectos de las farmacoterapias** (Varma MVS et al., 2003). Pero no se escapa también que una

inhibición indiscriminada de Pgp para tales fines podría a veces conducir a indeseados efectos tóxicos de los tratamientos con fármacos (Balayssac D et al., 2005).

En este sentido, **una de las potenciales aplicaciones de los inhibidores de Pgp ha sido la de intentar incrementar la penetración de los fármacos anticancerosos en tumores multirresistentes que expresan Pgp**, y que trataremos con más detalle más adelante. Otra aplicación relacionada tendría que ver con el tratamiento de tumores

(gliomas, neuroblastomas y astrocitomas, por ejemplo) que por su probable localización tisular estarían protegidos por la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, bastante inaccesibles a la mayoría de los fármacos anticancerosos (**Figura 29**).

Para el tratamiento de otras enfermedades del sistema nervioso central (SNC) podría ser igualmente deseable la penetración en el parénquima cerebral de algunos fármacos. Numerosos estudios han

demostrado la posibilidad de bloquear completa y duraderamente la actividad de Pgp en la barrera hematoencefálica en ratones modelo, pero sólo cuando se usaban inhibidores de Pgp muy eficaces (Mayer U et al., 1997; Hendrikse NH et al., 1998).

Como hemos comentado, **la biodisponibilidad oral es un parámetro importante para el uso práctico de muchos fármacos**, y la inhibición de Pgp en el intestino podría mejorar esta biodisponibilidad en el caso de muchos fármacos que son sustrato del transportador. Los primeros intentos de mejorar la absorción intestinal del fármaco anticanceroso paclitaxel demostraron, de hecho, tanto en

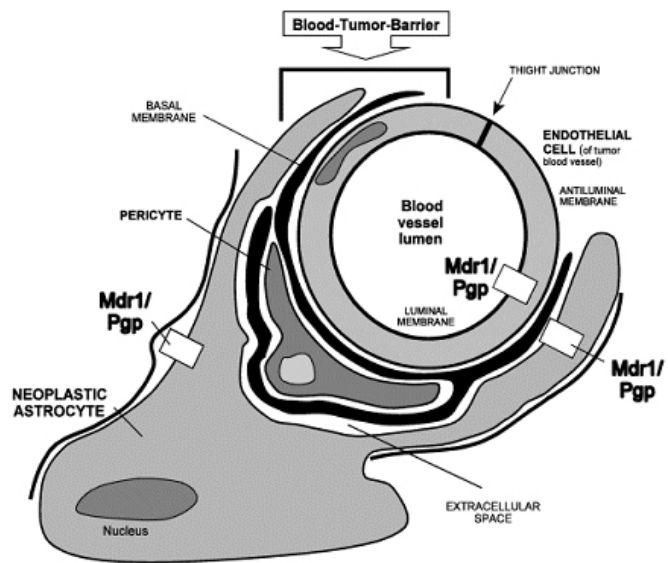


Figura 29: Ciertos tumores manifiestan multirresistencia a fármacos sólo por su mera localización tisular. Por ejemplo, los tumores del SNC pueden ser multirresistentes al encontrarse protegidos por la barrera hematoencefálica.

ratones como en humanos, que ciertos inhibidores de Pgp incrementaban enormemente su biodisponibilidad oral (van Asperen J et al., 1997; Meerum Terwogt JM et al., 1998). Se están realizando también ensayos clínicos con pacientes para comprobar si tales protocolos de farmacoterapia combinada tienen algún beneficio en el tratamiento del cáncer (Malingre MM et al., 2000).

En algunos casos justificados, también puede ser deseable incrementar la penetración de fármacos en el feto aunque, en la mayoría de los casos, lo recomendable sería más bien minimizar la exposición del feto a fármacos para prevenir efectos tóxicos en él. Un ejemplo de lo primero sería el incremento de la penetración en el feto de fármacos anti-VIH justo antes del parto, para reducir al máximo la posibilidad de transmisión del virus desde madres infectadas a sus hijos (Smit JW et al., 1999).

V.3. Funciones fisiológicas adicionales de Pgp MDR1

La función de Pgp como bomba expulsora de fármacos fuera de las células es, como hemos visto, una función **altamente conservada a lo largo de la evolución**, y prueba de ello es que la proteína de resistencia a antibióticos LmrA de *Lactococcus lactis* puede complementar funcionalmente a la Pgp humana en células de mamífero e inducir fenotipo MDR (van Veen HW et al., 1998). Sin embargo, si examinamos la distribución de expresión tisular de Pgp salta a la vista que esta proteína **debe desempeñar más funciones de las que se pensaron en un principio**. La función fisiológica de eflujo de fármacos se postuló sobre la base de su expresión en la membrana apical de numerosos epitelios (Cordon-Cardo C et al., 1990), y luego se confirmó tal función en ratones KO para *Mdr1a/1b* (Schinkel AH et al., 1997), como ya hemos comentado. Sin embargo, **Pgp también se expresa en las glándulas adrenales, en células madre hematopoyéticas, en células NK (natural killers), en células dendríticas presentadoras de antígenos, y en linfocitos T y B** (Klimecki WT et al., 1994; Randolph GJ et al., 1998). Aunque los ratones KO para Pgps son aparentemente competentes en lo que se refiere al funcionamiento de su sistema inmunológico (Schinkel AH et al., 1997), todavía no se

han reportado estudios exhaustivos en los que se demuestre que la capacidad de estos ratones para producir una respuesta inmunitaria eficiente contra patógenos o tumores es completa y normal, o que tengan una susceptibilidad a fenómenos de autoinmunidad semejante a la de ratones normales.

Es un hecho interesante que Pgp MDR1 tiene en los embriones humanos en desarrollo una expresión restringida a ciertos tejidos (van Kalken C et al., 1992), y que su **patrón de expresión en la placenta depende de la etapa del desarrollo embrionario** en que tal se determine (MacFarland A et al., 1994). La expresión de Pgp en barreras funcionales entre la sangre y determinados tejidos, y en las células epiteliales del tracto gastrointestinal y urinario es consistente con una función de eliminación de fármacos, mientras que la expresión selectiva en glándulas adrenales y células hematopoyéticas ha movido a muchos investigadores a proponer funciones adicionales para Pgp, como el **transporte de hormonas esteroideas, la regulación en células madre del desarrollo de linajes celulares, la regulación de la inducción de la apoptosis, de la función de algunos tipos de células del sistema inmune, de la actividad de canales de Cl⁻, y del transporte de lípidos y esterificación del colesterol**. Todas estas nuevas funciones atribuidas de forma directa o indirecta a Pgp MDR1 han promovido un vivo debate sobre cuál o cuáles son las verdaderas funciones fisiológicas de esta proteína, muchas de las cuales aún son objeto de un intenso estudio.

Actividad de canales de cloruro

Dado que Pgp MDR1 posee similitudes estructurales con la proteína CFTR, que funciona como un canal de cloruro activado por AMPc (Bear C et al., 1992), era razonable especular que Pgp podría también funcionar como un canal iónico. Parece claro ahora que **ni Pgp humana ni su homólogo de ratón Mdr1a poseen actividad intrínseca de canal iónico, pero sí parece que pueden regular un canal de cloruro endógeno de identidad aún no establecida**, por lo que, aunque indirectamente, modulan la actividad de canales (Valverde MA et al., 1992; Gill DR et al., 1992; Hardy SP et al., 1995). **La actividad reguladora de canales de cloruro de Pgp se inhibe por fosforilación mediada por la proteína**

kinasa C (Hardy SP et al., 1995; Vanoye CG et al., 1999). Y curiosamente, mientras que tanto la Pgp humana como la Pgp murina codificada por el gen *mdr1a* poseen esta actividad reguladora de canales de cloruro, el homólogo murino Mdr1b (que también es funcional en el transporte de fármacos) carece de ella (Bond TD et al., 1998).

A pesar de que esta actividad biológica de Pgp parece probada, su importancia fisiológica en el contexto del organismo aún es motivo de controversia. Por ello, la identificación y clonaje de los canales iónicos que Pgp podría estar regulando ayudaría a aclarar el verdadero alcance fisiológico de este fenómeno regulatorio.

Transporte de lípidos y tráfico intracelular de colesterol

Se ha propuesto que Pgp participa también en la translocación de fosfolípidos y esterificación del colesterol, y que posiblemente ambas funciones estén interrelacionadas de alguna manera. La proteína **Pgp MDR2 de ratón** (Ruetz S y Gros P, 1994) y su **homóloga humana Pgp MDR3** (van Helvoort A et al., 1996) pueden funcionar como **flipasas de fosfatidilcolina**, y también se ha visto que **Pgp MDR1 puede translocar análogos de fosfolípidos de cadena corta** (Romsicki Y y Sharom FJ, 2001) y fosfolípidos endógenos como la **esfingomielina** (Bezombes C et al., 1998). Esto podría explicar la supuesta función de Pgp como moduladora de la esterificación del colesterol (Luker GD et al., 1999; Slotte JP y Bierman EL, 1988), porque el agotamiento de esfingomielina en la cara interna de la membrana plasmática puede inducir la esterificación del colesterol, al liberar éste desde la membrana a los depósitos intracelulares (Slotte JP y Bierman EL, 1988). Sin embargo, **tampoco puede descartarse aún que Pgp, de algún modo, desempeñe un papel directo en el tráfico del colesterol** desde la cara interna de la membrana plasmática hacia el retículo endoplasmático (Garrigues A et al., 2002). Además, la regulación por Pgp de los cambios en los depósitos intracelulares de esfingomielina podría afectar a la apoptosis mediada por ceramida, tal y como comentaremos más adelante.

Pgp y sistema inmune

La relativamente elevada **expresión constitutiva de Pgp en células NK y linfocitos T CD8⁺** es intrigante, y se han realizado numerosos estudios para correlacionar este hecho con algún papel en la regulación de estas células efectoras. Ambos tipos celulares se unen a sus células diana e inducen muerte celular bien por medio del sistema Fas/Fas-ligando, o bien, en la mayoría de los casos, por liberación dentro de las células diana de los componentes citotóxicos de sus gránulos, tales como la proteína *perforina* o las *granzimas* (Smith MJ y Trapani JA, 1995). Varios estudios han demostrado que la inhibición de la función de transporte de Pgp usando inhibidores farmacológicos o anticuerpos monoclonales específicos resulta en una disminución de la actividad citolítica de células NK y T CD8⁺ (Gupta S, 1992; Chong AS, 1993). Es posible que la Pgp funcional sea necesaria para la unión óptima con las células diana, o bien para la inducción del proceso citolítico, o para ambas cosas. A pesar de ello, **la función citolítica *in vitro* de células NK de ratones KO para Mdr1a/1b no parece afectarse por la ausencia de Pgps** (Schinkel AH et al., 1997). Sin embargo, estos estudios no exploraron una implicación más amplia de Pgp en la función de células NK, ni realizaron experimentos *in vivo* diseñados específicamente para examinar la capacidad de tales células inmunitarias para eliminar células diana infectadas por virus o células tumorales. También es posible que Pgp sirva para **proteger a estas importantes células inmunitarias de la lisis por exposición al ambiente hostil generado en una respuesta inmune.**

Los linfocitos T CD8⁺ durante la respuesta inmune se encargan, además de eliminar células tumorales e infectadas por virus, de secretar citocinas para atraer y activar todo un repertorio de células inmunitarias. Pgp MDR1, al igual que otros transportadores ABC como la proteína bacteriana **HlyB** y la **Ste6p** de levaduras, podría ser capaz de **transportar polipéptidos a través de las membranas celulares** (Sharma RC et al., 1992). Evidencias procedentes de diversos grupos apoyan la posibilidad de que **Pgp esté implicada en el transporte de IL-1 β , IL-2, IL-4 e IFN- γ desde linfocitos activados hacia el medio externo** (Drach J et al., 1996). Aún queda por saber si Pgp transporta estas citocinas directamente o si

bien regula la actividad de alguna otra proteína que realice esa función, y si es en verdad una proteína biológicamente relevante para la secreción eficiente de citocinas durante la respuesta inmune.

Otro trabajo sugiere un papel de Pgp en la **migración transendotelial de las células dendríticas presentadoras de antígenos y de los linfocitos T durante la respuesta inmune** (Randolph GJ et al., 1998). Los autores del mismo sugieren la hipótesis de que Pgp podría estar modulando dicha migración celular al regular el transporte de la citokina IL-1 β o el factor de necrosis tumoral (TNF), o ambos, fuera de las células. Queda igualmente por establecer todavía la relevancia fisiológica de Pgp en esta importante función inmunitaria.

Pgp y regulación de procesos de diferenciación y muerte celular

En un esfuerzo por expandir células madre hematopoyéticas *ex vivo*, con la intención de mejorar los trasplantes de médula ósea y la terapia génica de células hematopoyéticas, se han transducido células madre hematopoyéticas murinas con vectores retrovirales para expresar el gen *MDR1* (Bunting KD et al., 1998). **Las células madre que sobre-expresaban Pgp, retransplantadas en ratones, se expandían progresivamente y generaban en los ratones un síndrome mieloproliferativo**, lo que indicaba que Pgp podría influir las decisiones de auto-renovación de células madre repobladoras de médula ósea. Aunque **el mecanismo por el que Pgp logra inducir la expansión clonal de células madre hematopoyéticas se desconoce todavía**, existen diversas explicaciones. Dado que los intentos previos de expandir *ex vivo* células madre hematopoyéticas fallaron debido a la pérdida de las mismas por diferenciación (Williams DA, 1993) o por apoptosis (Traycoff CM et al., 1998), es posible que Pgp regule alguno de estos fenómenos, si no ambos. Una expresión relativamente elevada de **Pgp podría impedir la diferenciación de las células madre**, dando lugar a la proliferación y amplificación de esta estirpe celular. De hecho, se ha postulado el potencial papel de Pgp en la regulación de la diferenciación celular debido a la observación de que **la expresión de Pgp disminuye durante la diferenciación de células madre pluripotentes del linaje mieloide** (Chaundhary PM y Roninson IB, 1991).

Alternativamente, la expresión de **Pgp podría conferir resistencia a la muerte celular disparada por toda una variedad de estímulos**. No en vano, son numerosos los trabajos que relacionan la expresión de Pgp con la regulación de la apoptosis (Bezombes C et al., 1998; Smyth MJ et al., 1998; Johnstone RW et al., 1999; Robinson LJ et al., 1997; Pallis M y Russell N, 2000; Ruefli AA et al., 2002; Turzanski J et al., 2005). Entre los factores pro-apoptóticos frente a los que Pgp parece ofrecer protección figuran la falta de factores de crecimiento, fármacos anticancerosos, Fas-ligando, $TNF\alpha$ y radiación UV. Estos estímulos inducen muerte celular por activación de la cascada de muerte dependiente de caspasas (Nagata S, 1997). La capacidad de Pgp para proteger a las células de la apoptosis desencadenada por los mencionados estímulos se revierte completamente con anticuerpos monoclonales anti-Pgp o con inhibidores farmacológicos del transportador, como el verapamil. Sin embargo, las células que expresan Pgp no son resistentes a toda clase de estímulos inductores de muerte: tanto células Pgp^+ como sus contrapartidas parentales Pgp^- son igualmente sensibles a la muerte inducida por proteínas formadoras de poros (perforina, pneumolisina, etc.), o por la proteína citotóxica de los gránulos de leucocitos, la granzima B (Johnstone RW et al., 1999). Sin embargo, sí puede conferir resistencia a la lisis celular inducida por el complemento activado (Weisburg JH et al., 1999).

Cabrían dos hipótesis para explicar la **inhibición de apoptosis mediada por Pgp**:

1) La ligación de moléculas como Fas-ligando y TNF a los receptores de muerte de la superficie celular resulta en la formación del llamado "complejo inductor señalizador de muerte" o DISC (death-inducing-signaling complex), que una vez formado recluta una serie de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD) y una caspasa proximal (caspasa 8). Ésta última es luego auto-activada y dispara la cascada de caspasas (Nagata S, 1997). Existen evidencias de que **la expresión de Pgp no afecta la formación de un DISC funcional, aunque sí impide la activación de la caspasa 8** (Ruefli AA et al., 2002).

2) La apoptosis es a menudo precedida de una ligera acidificación intracelular (Gottlieb RA et al., 1996), y la inducción de los eventos apoptóticos clásicos como la

fragmentación del DNA puede ser inhibida por el incremento del pH intracelular (pHi) (Robinson LJ et al., 1997). Es pues posible que **la expresión de Pgp altere el pHi, poniendo a la célula en un estado de inactividad de las caspasas que le conferiría una resistencia relativa a múltiples estímulos inductores de muerte** dependiente de caspasas. La expresión de Pgp se ha correlacionado con incrementos del pHi, lo que se ha propuesto que podría también causar una disminución de la concentración intracelular libre de fármacos debido a alteraciones del coeficiente de partición en la membrana celular, o al secuestro intracelular de los mismos en vesículas (Hoffman MM et al., 1996).

Otra forma en que Pgp podría modular la inducción de apoptosis es **afectando las rutas de síntesis y metabolismo de ceramida**. La ceramida se genera por la hidrólisis de la **esfingomielina (SM)**, catalizada por la enzima *esfingomielinasa ácida* (aSMasa) o *neutra* (nSMasa) (Kolesnick RN y Kronke M, 1998). Las dianas de ceramida para inducir apoptosis incluyen la mitocondria, de donde se libera *citocromo c* y el *factor inductor de apoptosis* (AIF), y la ruta de señalización de *SAPK/JNK* (stress-activated protein kinase/c-JUN N-terminal kinase). Esta ruta es una de varias rutas paralelas que terminan en la activación de las caspasas efectoras, responsables últimas de la muerte celular por apoptosis (Xia Z et al., 1995). **Se piensa que Pgp, en virtud de su capacidad para translocar SM hacia la cara externa de la membrana celular, limita la disponibilidad de la molécula para su hidrólisis por las SMasas en la cara interna de la membrana, con lo que se impide la producción de ceramida y la consecuente inducción de apoptosis** (van Helvoort A et al., 1996; Bezombes C et al., 1998). Pero, además, la ceramida citosólica, además de inducir apoptosis, puede ser metabolizada a *glucosil-ceramida* por la enzima ***glucosil-ceramida sintasa***, y esta nueva molécula tiene efectos promotores de la supervivencia celular. SE ha demostrado que Pgp es capaz de translocar glucosil-ceramida (Eckford P y Sharom FJ, 2005), y que en diversas líneas tumorales MDR, Pgp es capaz de translocar ésta molécula desde el citosol, donde se produce a partir de ceramida, hasta el interior del Golgi (Shabbits JA and Mayer LD, 2002; Turzanski et al., 2005). Así, de estas dos maneras, Pgp contribuiría

a disminuir la concentración libre de ceramida en el citosol y, por tanto, impediría su actividad inductora de apoptosis.

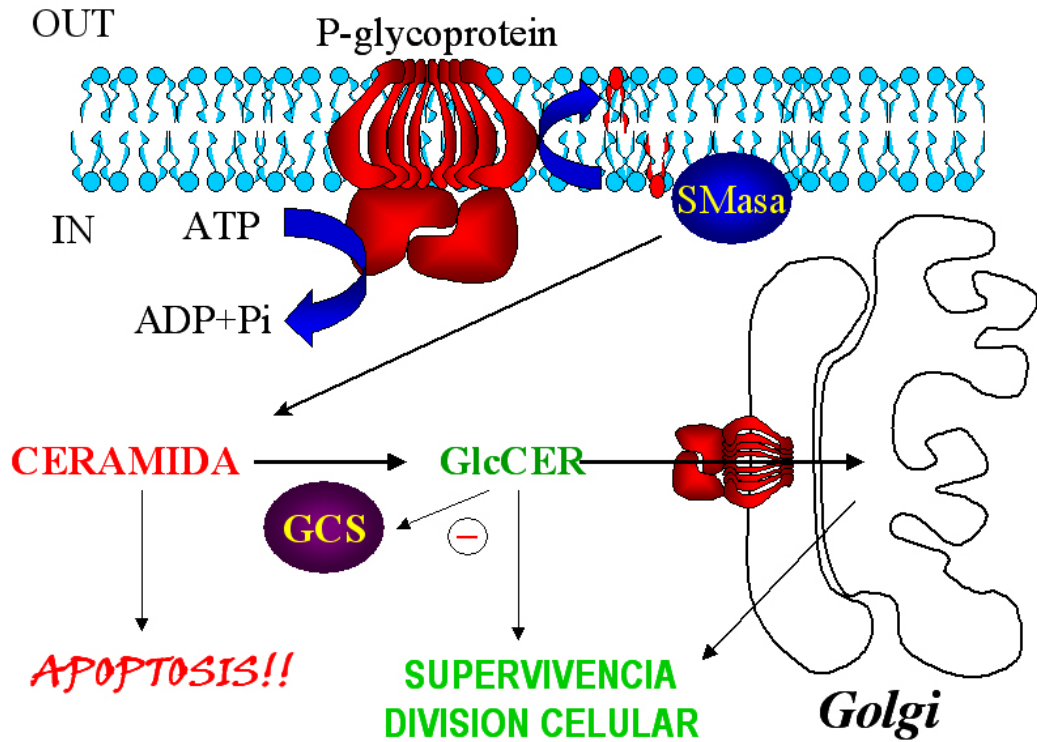


Figura 30: Inhibición de la **apoptosis dependiente de ceramida** ejercida por **Pgp**. El transportador es capaz de translocar el fosfolípido **esfingomielina** (precursor de la ceramida) desde la cara interna de la membrana celular hasta la externa, donde las **esfingomielinasas** no pueden procesar la molécula a ceramida ni, por tanto, iniciar la cascada de acontecimientos conducente a la apoptosis. Además, la ceramida citosólica en ciertos tumores es metabolizada a **glucosil-ceramida**, que promueve la supervivencia celular. Pero, para evitar la acumulación del producto, lo que inhibiría la enzima que cataliza su propia síntesis, Pgp puede también transportar esta molécula al **lumen del Golgi**, desde donde puede seguir ejerciendo sus efectos promotores de la supervivencia celular sin acumularse en el citosol.

VI. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y POLIMORFISMOS DE MDR1

La importancia de inhibir la función de Pgp en células tumorales como una potencial manera de incrementar la eficacia de los fármacos anticancerosos, como ya comentamos anteriormente, fue una posibilidad avanzada hace ya dos décadas. Esta noción a cobrado aún más fuerza desde que ha quedado patente la posibilidad de que Pgp también desempeñe un papel general como factor antiapoptótico que va más allá de la multiresistencia a fármacos, porque las células tumorales que sobre-expresan Pgp manifiestan resistencia a una amplio rango de inductores de la apoptosis dependiente de caspasas, como también hemos visto en un apartado anterior. Por todo esto, **la posibilidad de inhibir la activación transcripcional de Pgp en células tumorales, idealmente con efectos limitados sobre su expresión constitutiva en células normales, es un área que está recibiendo mucha atención por parte de los investigadores.** El gen *MDR1* humano se localiza en el cromosoma 7, banda p21-21.1, en un fragmento NruI de 600 Kb (Callen D et al., 1987), y su secuencia codificante está contenida en un fragmento XhoI de 120 Kb (Chin J et al., 1989). Este gen se extiende por más de 100 Kb, conteniendo 28 intrones de los que 26 interrumpen la secuencia codificante. El ARNm de *MDR1* tiene un tamaño de 4.7 Kb, por lo que la fracción codificante resulta en menos del 5% del total del gen *MDR1*.

VI.1. Sobre-expresión constitutiva en células resistentes a fármacos

Las células seleccionadas para ser resistentes a los fármacos clásicos del fenotipo MDR a menudo exhiben sobre-expresión constitutiva de Pgp. Aunque ésto suele ser el resultado de la **amplificación del gen *MDR1*** (Fojo AT et al., 1985), que suele involucrar a otros 4 ó 5 genes vecinos que no tienen nada que ver con MDR y que se

organizan en un amplicón (de Bruijn MHL et al., 1986), tal **sobre-expresión de Pgp tiene también una componente transcripcional** que ha sido verificada en varios laboratorios (Shen DW et al., 1986). Se ha observado recientemente que la **proteína MEF1** (*MDR1* promoter enhancing factor 1), de 130 KDa, interactúa con un elemento del promotor de *MDR1* para producir un **incremento en su tasa de transcripción** y, curiosamente, se la ha observado en células HL60 resistentes a fármacos pero no en la línea parental no resistente (Ogretmen B y Safa AR, 2000), lo que sugiere una función directa en la activación de *MDR1*. El mismo elemento promotor que une MEF1 en la mencionada línea celular MDR parece unir, en cambio, un **complejo inhibidor formado por NF- κ B y c-Fos** en células parentales sensibles a fármacos MCF-7, pero no en la línea resistente MCF-7/ADR (Ogretmen B y Safa AR, 2000). El mecanismo por el que MEF-1 regula la transcripción de *MDR1*, su relación con NF- κ B/c-Fos, y la frecuencia con la que ambos complejos participan en la regulación de la activación de *MDR1* están aún por dilucidar.

En otros estudios, se ha establecido una relación entre el **grado de metilación de una secuencia promotora de *MDR1*** y los niveles de expresión del gen. Dicha región se ha observado hipometilada tanto en células resistentes KB/VJ300 (sobre-expresan Pgp al nivel de transcripción) como en células KB-C1 (sobre-expresan Pgp por amplificación del gen), pero no así en la línea parental KB-3-1 (Kusaba H et al., 1999). El mecanismo que existe tras esta correlación es aún desconocido.

*VI.2. Supresores de tumores, oncogenes y transcripción de *MDR1**

Se han observado altos niveles de expresión de Pgp en tumores naïve para fármacos, incluso cuando los tejidos de origen expresan poca o ninguna Pgp. Esto hace pensar que **la expresión constitutiva del gen *MDR1* podría estar influenciada en algunas células por los propios eventos conducentes a la transformación tumoral**. Los niveles de expresión alterados de varias proteínas oncogénicas y supresoras tumorales que se observan a menudo en algunos cánceres multirresistentes sugieren que podrían desempeñar algún papel en la regulación de

la expresión de Pgp. Por ejemplo, se ha observado que la **versión salvaje de p53 reprime la transcripción del gen MDR1** (Chin KV, 1992; Zastawny RL et al., 1993; Thottassery Z et al., 1997) como consecuencia de la interacción directa con un elemento proximal del promotor del gen (Johnson RA et al., 2001), y que esta represión génica puede involucrar cofactores específicos del tipo celular. Paradójicamente, **varias formas mutantes comunes de p53 son capaces de activar, en lugar de reprimir, al promotor de MDR1** (Dittmer D et al., 1993). Es posible que los efectos de p53 sobre la expresión de *MDR1* en varias líneas celulares y tumores esté influenciada por la expresión basal de Pgp en cada caso, por el complemento de p53 endógena presente (salvaje y/o mutante), y por los niveles de varios moduladores de la actividad de p53 (e.g. proteínas compañeras, reguladores postraduccionales, etc.).

Otros estudios han demostrado que **el gen MDR1 es diana de la ruta de señalización de Ras/Raf** (Kim SH et al., 1996), del ubicuo **factor EGR-1** (McCoy C et al., 1995), y de **WT-1** (Wilm's tumor suppressor protein; McCoy C et al., 1999), y que todos ellos parecen interaccionar con una discreta región del promotor de *MDR1*.

Finalmente, se ha establecido una relación entre el **gen supresor de tumores APC** (adenomatous polyposis coli) y la transcripción del gen *MDR1* (Yamada T et al., 2000). Al parecer, mutaciones en el APC, que suelen aparecer como un evento temprano en la mayoría de pacientes con cáncer colorrectal esporádico hereditario, provocan la acumulación de ***β-catenina***, la cual es coactivadora del **complejo de transcripción TCL/LEF** (T cell factor/lymphoid enhancer factor). Este complejo, a su vez, activa el promotor de *MDR1* a través de varios sitios de unión localizados entre -1813 y -275. Esta evidencia sugiere una **correlación directa entre las mutaciones de APC y la sobre-expresión aberrante de Pgp en muchos cánceres colorrectales.**

VI.3. Inducción de la transcripción de MDR1

Además de su activación durante la adquisición de fenotipo MDR, **el gen MDR1 se expresa diferencialmente en tejidos normales como consecuencia tanto**

de iniciadores de la diferenciación como en respuesta a estrés ambiental.

Los mayores niveles de expresión fisiológica de MDR1 se encuentran, como ya vimos, en las glándulas adrenales, riñones, yeyuno, colon y las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y de los testículos. Además de los factores específicos de célula y de tejido que pueden controlar la transcripción de MDR1, los factores ambientales como el **choque térmico** (Miyazaki M et al., 1992), **citokinas** (McRae MP et al., 2003), **agentes diferenciadores** (Bates SE et al., 1989; Zhou DC et al., 1993), **agentes quimioterapéuticos** (Chaudhary PM y Roninson IB, 1993), **radiación UV y rayos X** (McClellan S et al., 1993; Hu Z et al., 2000), **oncogenes** (Chin KV et al., 1992), y **genes supresores de tumores** (Zastawny RL et al., 1993; Thottassery Z et al., 1997) pueden influenciar los niveles de Pgp en diferentes sistemas. Los elementos del ADN y factores proteicos que determinan la respuesta de MDR1 a muchos de estos estímulos han sido ya identificados (Scotto KW, 2003).

Expresión inducible de MDR1 en tumores humanos

La expresión de Pgp puede inducirse transitoriamente en cultivos celulares tras exposición a un agente quimioterapéutico (Chaudhary PM y Roninson IB, 1993). Igualmente, esta **rápida inducción de Pgp sucede también en tumores de pacientes durante el tratamiento con quimioterapia** (Albohoda A et al., 1999), los cuales pueden incrementar sus niveles de ARNm *MDR1* tras tan sólo 10 minutos de ser expuestos a doxorubicina. Esta rápida respuesta sugiere un **papel de Pgp mucho más importante de lo previamente reconocido en el desarrollo de resistencia a fármacos** en tumores sólidos, y que va más allá de la previa función atribuida a Pgp como factor de supervivencia en la selección de resistencia en dichos tumores. Además, considerando las observaciones que relacionan Pgp con un mecanismo general antiapoptótico, y la variedad de estímulos que son capaces de inducir la expresión de Pgp, todo apunta a una **tremenda relevancia de Pgp en la determinación de la eficacia de los regímenes terapéuticos** (al margen del fenotipo MDR), que no se había considerado hasta ahora, y que justifican también nuevas aproximaciones terapéuticas orientadas a la regulación de la expresión de Pgp.

El "enhanceosoma MDR1"

MDR1 ha sido considerado desde los primeros estudios de su función y regulación como un **gen de respuesta a estrés**, puesto que su actividad puede ser modulada por adversidades ambientales (Scotto KW, 2003). Las señales de estrés procedentes de muy diversos estímulos convergen en una **única región del promotor de MDR1 referida como el "enhanceosoma MDR1"** (Scotto KW, 2003). Esta región incluye sitios de unión para el factor trimérico de transcripción **NF-Y** y para la familia **Sp** de factores de transcripción. Juntas, estas proteínas de unión al ADN reclutan la **histona acetiltransferasa PCAF** al promotor de *MDR1*, resultando en la **acetilación de las histonas** del mismo y en la subsiguiente **activación transcripcional**, muy probablemente resultante de progresivas remodelaciones de la cromatina local. Aunque el mecanismo último por el que múltiples señales se integran para producir como respuesta final la activación del promotor de MDR1 se desconoce todavía, el papel central del "enhanceosoma de *MDR1*" en la regulación de la transcripción del gen hace de él una atractiva diana terapéutica.

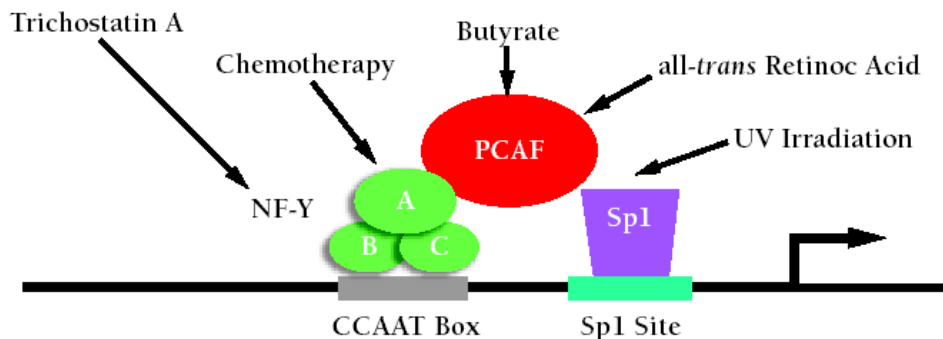


Figura 31: El "enhanceosoma" MDR1

VI.4. Polimorfismos del gen MDR1 humano

El primer polimorfismo del gen *MDR1* humano de que se tuvo noticia fue aislado de glándulas adrenales (Kioka N et al., 1989), y la secuencia de aminoácidos deducida indicaba dos sustituciones aminoacídicas: la primera, **Gly185Val**, aparece típicamente en líneas celulares seleccionadas con colchicina, pues este cambio aminoacídico hace a la proteína más eficiente en el eflujo de este fármaco (Cardarelli

CO et al., 1995). La segunda, **Ala893Ser**, sí parecía reflejar un polimorfismo genético.

El primer rastreo metódico de polimorfismos en el gen *MDR1* completo no llegó hasta diez años después (Hoffmeyer, S et al., 2000), y reveló la existencia de 15 **SNPs** (*single nucleotide polymorphisms*) diferentes. Posteriores trabajos han engordado esta cifra hasta un total de **28 SNPs en 27 posiciones diferentes y tres inserciones/deleciones en el gen *MDR1*** (Sakaeda T et al., 2002). Siete de ellos se localizan en intrones, otros afectan a exones pero son silenciosos, sin provocar cambios en la composición aminoacídica de la proteína, y 11 de ellos sí la cambian (por ejemplo: A61G, T307C, G1199A, G2677T). Se han definido **15 alelos basados en las frecuencias de 11 polimorfismos**: C-4T (no codificante), G-1A (no codificante), A61G (Asn21Asp), A548G (Asn183Ser), G1199A (Ser400Asn), C1236T (silencioso), C1474T (Arg492Cys), C2650T (silencioso), G2677T (Ala893Ser), T3421A (Ser1141Thr) y C3435 (silencioso) (Kim RB et al., 2001). Seis de los 11 implican cambios en la composición aminoacídica, y el resto son mutaciones conservativas.

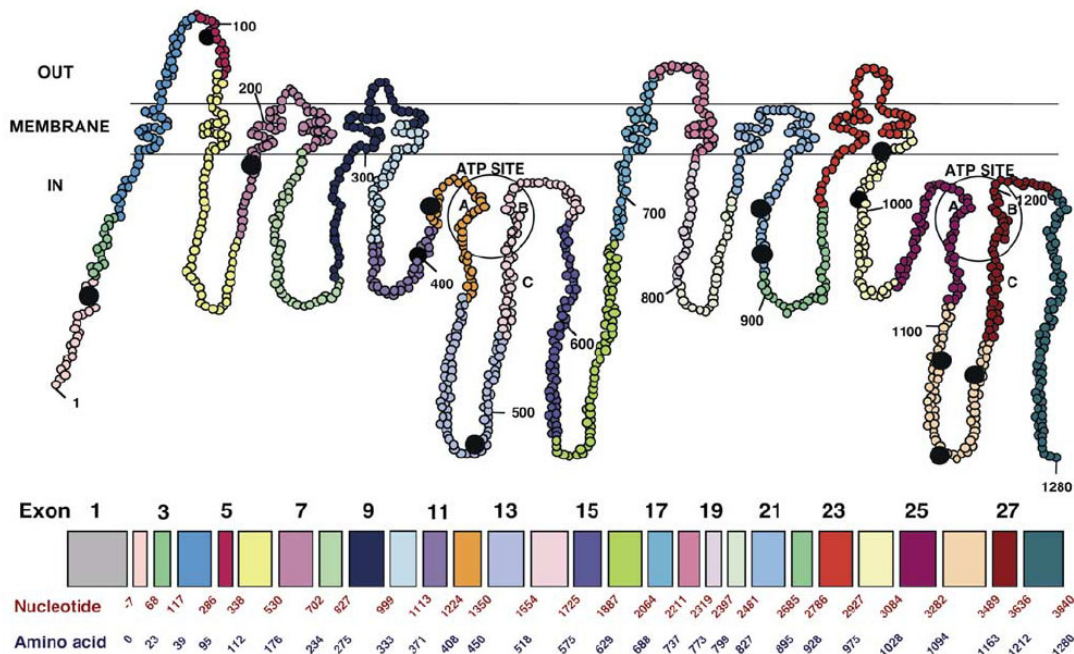


Figura 32: Distribución de los SNPs (en círculos negros) que se conoce que afectan a la secuencia codificante de gen *MDR1* humano, y su localización en la topología 2D de la Pgp. Abajo, se muestran los 28 exones del gen, con los colores correspondientes a las regiones de la proteína codificadas por cada uno de ellos.

VI.5. Influencia de variantes genotípicas de *MDR1* en la expresión, función y farmacocinética

Se ha realizado un exhaustivo estudio preliminar para determinar **si alguna variante polimórfica del gen *MDR1* está asociada a cambios significativos en la funcionalidad de la proteína Pgp**, pues, de ser así, ello tendría un enorme impacto en los procesos de absorción, distribución tisular y eliminación de fármacos que son sustratos de Pgp. Este estudio ha arrojado la conclusión de que **ninguno de los cinco polimorfismos de *MDR1* más frecuentes** en las poblaciones humanas (A61G, T307C, G1199A, G2677T y G2995A) **afecta ni a la localización de Pgp en la superficie celular, ni a los niveles de expresión de la proteína, ni a su actividad funcional como bomba exportadora de fármacos** (Ambudkar SV et al., 2003) o, al menos, no de una forma dramática en lo referente a la capacidad de transporte de fármacos. Por ello, globalmente, puede afirmarse que **ninguno de tales SNPs produce un cambio funcional fundamental de Pgp *in vivo***. Esto es consistente con el alto grado de conservación de la secuencia del gen, y sugiere que su función no es prescindible en las poblaciones humanas.

Existen, sin embargo, varios ejemplos en la literatura que demuestran **cambios en la especificidad de sustrato de Pgp resultantes de variaciones polimórficas del gen**. Por ejemplo, se ha observado un ligero incremento en los niveles de resistencia a doxorubicina, pero sin cambios en la resistencia a colchicina y vinblastina, de células que expresan el gen *MDR1* con un cambio en la posición 2677 (exon 21), **Ser893Ala** (Kioka et al., 1989). La mutación **Gly185Val**, que, según este trabajo, suele estar ligada a este SNP, ha sido claramente demostrado que es responsable de una alteración importante del perfil de resistencia a fármacos conferido por Pgp, incluso cuando la proteína porta la mutación Gly185Val pero no el polimorfismo. También se ha observado que el **polimorfismo de la posición 893** confiere una capacidad incrementada de bombear digoxina, que es un sustrato típico de Pgp (Mayer et al., 1996). Y también se ha relacionado a este polimorfismo con una **mayor probabilidad de sufrir nefrotoxicidad inducida por el fármaco**

tacrolimus, que es un potente inmunosupresor empleado tras el transplante de determinados órganos, y también inhibidor de Pgp (Yamauchi et al., 2002).

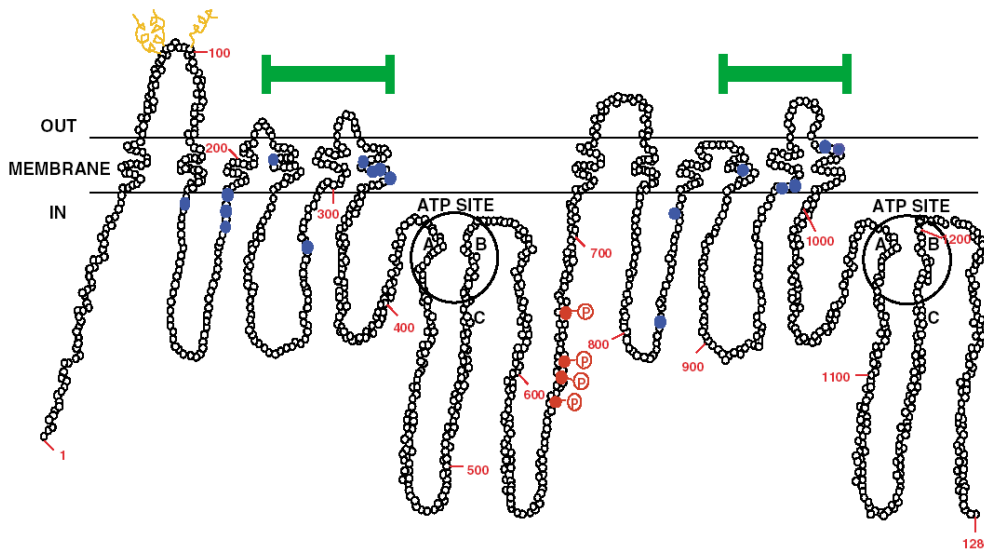


Figura 33: Modelo topológico de Pgp en el que se muestran, en círculos azules, las posiciones aminoacídicas que, cuando mutan, alteran la especificidad de sustrato del transportador. En círculos rojos se representan los sitios fosforilables de la proteína.

Pero la variante polimórfica de Pgp que contribuye más claramente a una respuesta variable de los pacientes a determinados fármacos sustrato de Pgp es un **SNP en el exón 26 (C/T3435)**, que curiosamente no produce ningún cambio en la composición aminoacídica de la proteína. La **transición de C a T en la posición 3435 ha sido asociada con una disminución de la expresión intestinal de Pgp** y un incremento de la absorción oral de fármacos (Hoffmeyer et al., 2000). Se ha encontrado también una **mayor frecuencia del alelo C para esta posición entre las poblaciones africanas que en las europeas y asiáticas**, lo que indica que la frecuencia de los alelos C/T3435 está profundamente influenciada por la etnicidad (Ameyaw et al., 2001). Esta asociación entre tal fenotipo y un polimorfismo que no produce cambios en la composición aminoacídica de la proteína podría explicarse diferencias en la eficiencia con que cada variante polimórfica del ARNm es procesada. Este polimorfismo podría producir también un “splicing” alternativo que podría producir una proteína ligeramente más corta que su versión salvaje. Lo que parece más probable, sin embargo, es que en algunas poblaciones el alelo en 3435

esté asociado a otro polimorfismo que afecte a la Pgp o a la expresión de otro gen vecino (Ambudkar SV et al., 2003).

VII. REVERSIÓN DEL FENOTIPO MDR MEDIANTE MODULADORES DE LA P- GLICOPROTEINA MDR1

Puesto que la **multirresistencia a fármacos (MDR)** es el principal obstáculo que existe para el éxito clínico de la quimioterapia de los cánceres humanos, el desarrollo de agentes farmacológicos capaces de interferir los mecanismos de resistencia a fármacos en tumores ha sido uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica durante los últimos 10-20 años. El conocimiento de los mecanismos moleculares de esta multirresistencia a fármacos ha contribuido enormemente al desarrollo de **compuestos revertidores del fenotipo MDR**. En particular, la confirmación del papel de Pgp en este fenómeno le ha valido convertirse en la principal diana terapéutica para el desarrollo de tales compuestos revertidores, que funcionarían bloqueando el eflujo de agentes anticancerosos mediado por Pgp.

Se han identificado **centenares de compuestos capaces de modular la función de Pgp**, al menos *in vitro*. Estos moduladores pertenecen a numerosas familias de compuestos químicos de muy variada naturaleza (Krishna R y Mayer LD, 2000). Aunque algunos de estos compuestos están ya en fase clínica de experimentación para el tratamiento de algunos tipos de cánceres, y nuevas generaciones de inhibidores están siendo identificadas a un ritmo rápido, una de las mayores preocupaciones del uso de estos compuestos es la **potencial interferencia que puedan crear en la expresión de Pgp en tejidos sanos**, particularmente en lo referente a los efectos farmacocinéticos y de biodistribución de compuestos anticancerosos que tal interferencia podría acarrear.

Como vamos a ver, ésta no va a ser el único problema que va a plantear el empleo clínico de moduladores de la función de Pgp: además de la **necesidad de especificidad de acción**, y de **hacer accesibles los moduladores allí donde**

son necesarios (esto es, en el tumor, incluido su núcleo), existe el problema de que estos compuestos sean realmente eficaces en la reversión de la MDR dependiente de Pgp.

Una vez identificados los primeros moduladores de la función de la bomba, se procedió a realizar ensayos clínicos preliminares en pacientes reales de cáncer para comprobar si el uso de tales compuestos mejoraba la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos clásicos. Sin embargo, las prometedoras expectativas iniciales del uso clínico de los inhibidores de Pgp no se han traducido todavía en una aplicación clínica útil. De hecho, a día de hoy, **no hay un solo inhibidor de Pgp cuyo uso clínico haya sido aprobado, ni se ha confirmado la utilidad clínica de ninguno de ellos en el tratamiento de tumores MDR** (Robert J y Jarry C, 2003). Por ello, es necesario conocer las razones de este fracaso, para poder así abordar satisfactoriamente el desarrollo racional de nuevos inhibidores de Pgp que tengan alguna esperanza de poder ser eficaces en la reversión de la multirresistencia clínica a fármacos en tumores, y contribuir así a incrementar la eficacia de la quimioterapia del cáncer.

De todas maneras, conviene no perder de vista que **Pgp es sólo una de las múltiples piezas del rompecabezas del fenómeno MDR en tumores**, y que, como comentamos ya en el primer apartado de esta introducción, una estrategia encaminada exclusivamente a la modulación de Pgp, bien de su expresión o de su actividad, conseguirá, en el mejor de los casos, sólo éxitos parciales en la mejora del tratamiento quimioterapéutico de los tumores multirresistentes.

VII.1. Relevancia clínica de Pgp en tumores

La función de Pgp tanto en el control de la absorción, distribución y excreción de fármacos (Schinkel AH et al., 1997), por una parte, como en la resistencia a fármacos en modelos de laboratorio (Kartner N, et al., 1983), por otra, ha sido confirmado ya fuera de toda duda. En cambio, **la demostración de que Pgp desempeña también una función relevante en el desarrollo de MDR en tumores no se ha conseguido ni tan rápida ni tan claramente**, pero todas las

evidencias parecen confirmar esta sospecha (Leonard GD et al., 2003). En los tejidos cancerosos, **la expresión de Pgp es típicamente más alta en aquellos tumores que derivan de tejidos que expresan la proteína de manera fisiológica**, como ocurre en las células epiteliales de colon, riñón, glándulas adrenales, páncreas e hígado, lo que potencialmente puede contribuir a la existencia de una resistencia a fármacos en tales tumores ya desde antes de iniciarse la quimioterapia. En otros tumores, la expresión de Pgp puede ser muy baja o inexistente en el momento del diagnóstico del tumor, pero incrementarse mucho tras la exposición del mismo a la quimioterapia, resultando entonces en un **fenotipo MDR adquirido**. Así, la sobre-expresión de Pgp en tumores se ha detectado ya en el momento de diagnóstico en leucemias (Campos L et al., 1992; Goasguen JE et al., 1993), linfomas (Niehans GA et al., 1992), sarcomas infantiles y de adulto (Gerlach JH et al., 1987; Goldstein LJ et al., 1989; Chan HS et al., 1990), y en neuroblastomas (Chan HS et al., 1991). La expresión de Pgp se ha correlacionado claramente en algunos casos con una **pobre respuesta a la quimioterapia** (Bradley G y Ling V, 1994). Parece claro, por tanto, que la sobre-expresión de Pgp en un tumor es, en algunos casos, un **marcador relevante** a la hora de predecir la respuesta de ese tumor a la quimioterapia.

VII.2. Reversión del fenotipo MDR, debido a la sobre-expresión de Pgp, mediante moduladores de la proteína

La reversión del fenotipo MDR, o **quimiosensibilización** de un tumor a la quimioterapia, implica la administración conjunta de un inhibidor de Pgp con un fármaco o fármacos anticancerosos, con el objetivo de **incrementar la acumulación intracelular de los citotóxicos en las células tumorales por medio de la inhibición de la actividad de la bomba**. Centenares de compuestos han demostrado ser capaces de inhibir la actividad transportadora de fármacos de Pgp y, por tanto, de revertir la multirresistencia celular a fármacos en células tumorales. Estos moduladores de la actividad de Pgp pertenecen a diversas clases de agentes farmacológicos, entre los que figuran bloqueantes de canales de calcio,

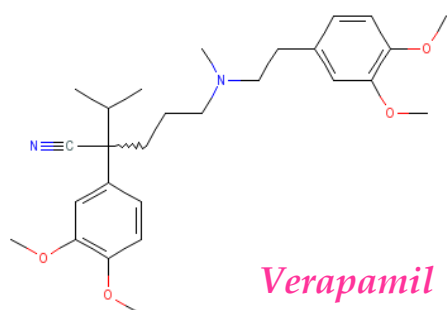
inhibidores de calmodulina, vasodilatadores coronarios, alcaloides indólicos, quinolinas, hormonas esteroideas, ciclosporinas, surfactantes y anticuerpos (Krishna R y Mayer LD, 2000).

Inhibidores de Pgp de 1ª generación

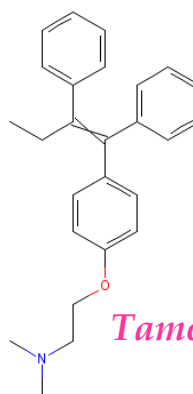
Estos compuestos no fueron desarrollados específicamente como inhibidores de Pgp, sino que, ya antes de ser reconocida su capacidad inhibidora de la bomba de fármacos, **había sido aprobado su uso farmacológico para otras aplicaciones terapéuticas**. Esto supuso un gran ahorro de tiempo y de trabajo a la hora de diseñar los primeros ensayos clínicos con revertidores MDR en pacientes de cáncer, pues como **su uso en clínica ya estaba aprobado**, no había que realizar toda la tediosa serie de estudios preliminares que confirmasen la seguridad de su empleo para la salud de los pacientes.

El primer compuesto de esta clase identificado como inhibidor de Pgp fue el inhibidor de canales de calcio **verapamil** (Tsuruo T et al., 1981, 1982, 1983a), y luego se demostró que esta propiedad era compartida por muchos otros antagonistas de canales de calcio (Tsuruo T et al., 1983b; Ramu A et al., 1984; Klohs WD et al., 1986). Luego fueron añadidos a la lista inhibidores de calmodulina como **trifluorperazina** (Ganapathi R y Grabowski D, 1983), **flupenthixol** (Ford JM et al., 1989), alcaloides indólicos como **quinina** y **quinidina** (Sehested M et al., 1989; Eliason JF et al., 1990), y el inmunosupresor **ciclosporina A (CsA)** (Chao NJ et al., 1990). Éste último demostró ser el inhibidor de Pgp de 1ª generación más potente *in vitro*, por lo que, junto con algunos otros como verapamil y nifedipina, fue testado en modelos de tumor murino, demostrando incrementar significativamente la vida promedio de ratones inoculados con líneas de células tumorales (Slater LM et al., 1986; Tsuruo T et al., 1981). Sin embargo, ensayos en humanos dieron resultados bastante decepcionantes debido a que, las altas dosis necesarias para causar una inhibición efectiva de Pgp en los tumores *in vivo*, desplegaban sus otras actividades farmacológicas, lo que resultaba en **toxicidades inaceptables para los pacientes** (Ferry DR et al., 1996; Krishna R y Mayer LD, 2000). La escasa eficacia de los inhibidores de 1ª generación parece deberse a que **la mayoría de ellos son en sí**

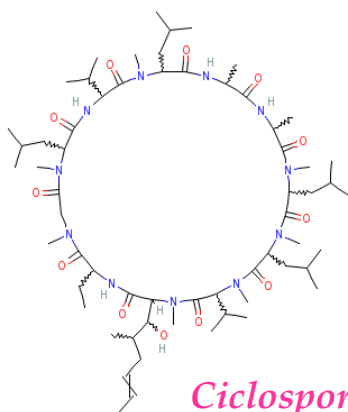
mismos sustratos transportables por Pgp y, en consecuencia, funcionan compitiendo con los compuestos citotóxicos por ser expulsados por la bomba. Además, **carecen de especificidad de acción**, por lo **que son capaces de inhibir otros transportadores de fármacos distintos de Pgp y enzimas detoxificantes**, provocando así **interacciones farmacocinéticas impredecibles con los fármacos anticancerosos**. Esto contribuye a agravar aún más la toxicidad intrínseca de los tratamientos quimioterapéuticos del cáncer, ya de por sí prohibitiva en algunos casos.



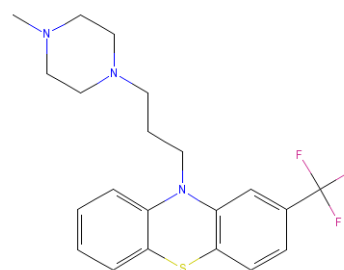
Verapamil



Tamoxifeno



Ciclosporina A



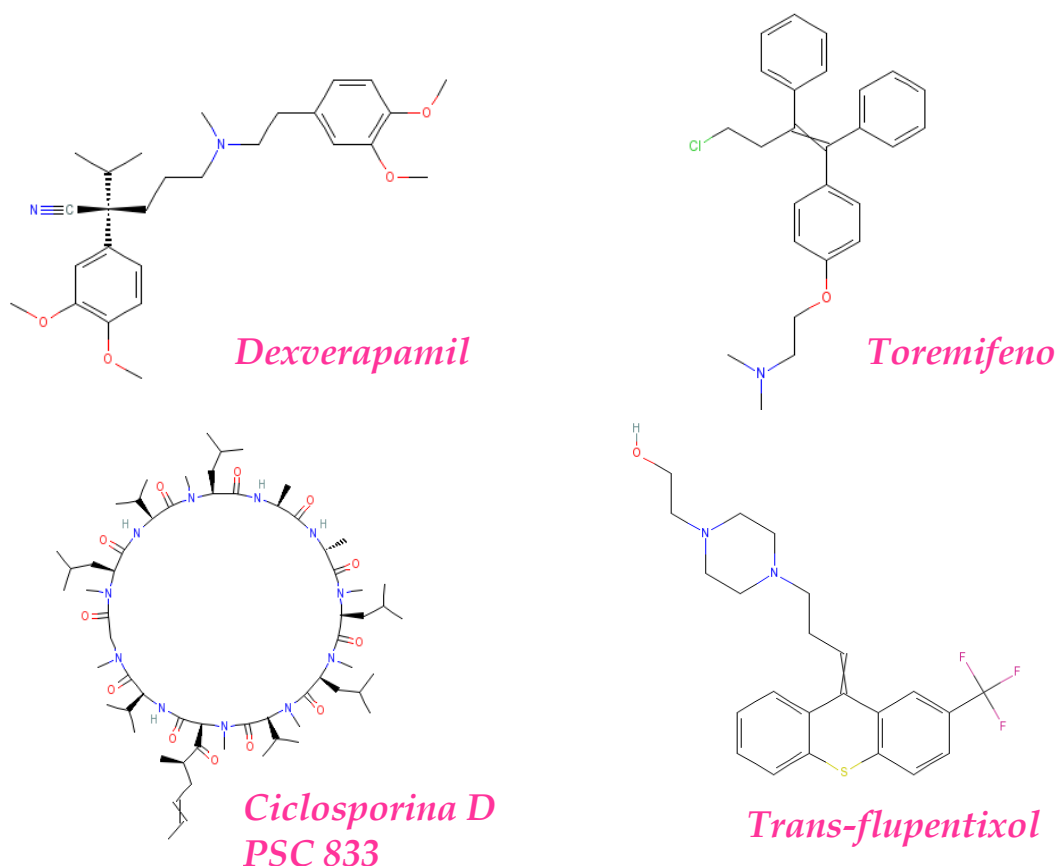
Trifluoroperazina

Inhibidores de Pgp de 2^a generación

Los decepcionantes resultados de los ensayos clínicos con inhibidores de 1^a generación estimularon el desarrollo de nuevas moléculas **más potentes y también más selectivas para el transportador Pgp**, lo que contribuiría a disminuir sus efectos tóxicos colaterales. Estas nuevas moléculas fueron,

básicamente, **análogos estructurales de los inhibidores de 1ª generación** que, al presentar modificaciones sutiles de su estructura molecular, perdían la capacidad de unirse a las dianas celulares responsables de su actividad farmacológica original (como bloqueantes de calcio, inmunosupresores, etc.), pero no así su habilidad para inhibir Pgp.

Entre los moduladores de Pgp de 2ª generación figuran los **análogos estructurales del verapamil** (dexverapamil, emopamil, Ro11-2933, etc.), y el análogo no inmunosupresor de CsA **PSC 833 (valsopodar)**. Estos compuestos demostraron ser **más potentes que sus predecesores y también menos tóxicos** (Krishna y Mayer, 2000).



El mejor estudiado de todos ellos es el PSC 833, que fue seleccionado entre otros análogos de CsA por carecer de propiedades inmunosupresoras y por ser capaz de inhibir Pgp con una potencia 10-20 veces mayor que la de CsA (te Boekhorst PA et

al., 1992). Por su potente actividad anti-Pgp, ha sido sometido a estudio en numerosos ensayos clínicos en combinación con fármacos citotóxicos (Boote DJ et al., 1996; Advani R et al., 2001). Sin embargo, durante tales ensayos, se observaron **importantes efectos del compuesto en la farmacocinética de los fármacos anticancerosos** etopósido (Boote DJ et al., 1996), doxorubicina (Giaccone G et al., 1997), mitoxantrona (Advani R et al., 1999) y paclitaxel (Fracasso PM et al., 2000), con los que era coadministrado. En la mayor parte de tales casos se encontró que o bien la concentración plasmática del citotóxico se doblaba, o que su eliminación se retardaba y, con ello, se aumentaba su vida media en el organismo de los pacientes tratados con PSC 833. Por lo tanto, **no fue posible distinguir claramente entre el efecto farmacocinético** causado por este inhibidor (incremento en la exposición del organismo a los fármacos anticancerosos) y sus **pretendidos efectos farmacodinámicos** (incremento en la captación de los anticancerosos por las células tumorales). Para paliar el problema se propuso reducir la dosis de anticancerosos administrada a los pacientes en un 30-50%. Sin embargo, para que los tratamientos no perdiesen toda su eficacia terapéutica, ello exigiría monitorizar y ajustar la dosis de quimioterapia para conseguir unos niveles plasmáticos de anticancerosos similares a los que se alcanzan cuando no se administra el modulador (Advani R et al., 2001; Canal P et al., 1998). Pero **el riesgo de infra- o sobredosificar a un porcentaje considerable de pacientes** es muy alto, si tenemos en cuenta la enorme variabilidad que existe de unos pacientes a otros en lo referente a la farmacocinética de los agentes citotóxicos empleados en quimioterapia (Damiani D et al., 1998). Estas interacciones farmacológicas de PSC 833 con los fármacos anticancerosos han impedido el desarrollo del compuesto como modulador MDR clínicamente útil, y parecen deberse, casi con toda seguridad, al hecho de su falta de especificidad por Pgp, pues se ha demostrado que **PSC 833 también inhibe otras proteínas, como la enzima detoxificante citocromo P450 3A4** (Fischer V et al., 1998), **y los transportadores ABC hepáticos** implicados en la eliminación biliar de fármacos **BSEP** (bile salt export pump) o **ABCB11**, y la **cMOAT/MRP2** o **ABCC2** (Bohme M et al., 1993).

Inhibidores de Pgp de 3ª generación

Los inhibidores de 3ª generación **son moléculas que inhiben muy potente y, sobre todo, muy específicamente la Pgp**, y que han sido el resultado de aproximaciones de diseño racional de fármacos basadas en relaciones de estructura-actividad y química combinatoria, con el objetivo de superar las limitaciones de los inhibidores de 2ª generación (Krishna R y Mayer LD, 2000). Existía el temor de que, incluso inhibidores absolutamente específicos de Pgp, produjeran todavía interacciones farmacológicas inaceptables con los fármacos anticancerosos de la quimioterapia por el mero hecho de inhibir no sólo la Pgp de tumores, sino también la Pgp de tejidos sanos que, como ya hemos tratado, cumple importantísimas funciones fisiológicas relacionadas con la manera en que los fármacos son absorbidos, distribuidos y eliminados del organismo (Lum B y Gosland M, 1995). Estos compuestos de 3ª generación, sin embargo, **no parecen manifestar las adversas interacciones farmacocinéticas con los citotóxicos que sí tenían los de 2ª generación** (Thomas H y Coley HM, 2003), aunque estos resultados preliminares **deben ser interpretados con cautela**, ya que en ensayos más recientes se ha comprobado que, si bien no tan alarmantes como en el caso de los inhibidores Pgp de 2ª generación, **no puede afirmarse que los de 3ª generación carezcan absolutamente de efectos sobre la excreción de los citotóxicos** (Callies S et al., 2004; Sandler A et al., 2004; Le LH et al., 2005).

La causa de que los inhibidores de 3ª generación ejerzan unos efectos mínimos en la farmacocinética de los agentes anticancerosos debemos buscarla en el hecho de que, al menos en el rango de concentración en que inhiben Pgp, **estos compuestos no parecen afectar a los enzimas detoxificantes tipo *citocromo P450*** (Wandel C et al., 1999; Dantzig AH et al., 1999), **ni tampoco a otros transportadores ABC distintos de Pgp e implicados como ésta en la eliminación de fármacos del organismo**. Así pues, aunque los inhibidores de 3ª generación pueden estar bloqueando Pgp en tejidos sanos además de en los tumores, este hecho no es tan grave en términos de toxicidad de la quimioterapia para los pacientes, debido a que **Pgp no trabaja sola en el desempeño de sus**

funciones fisiológicas sino que, con las proteínas MRP1, MRP2, BSEP y BCRP, entre otras, con quienes comparte espectros de reconocimiento de sustratos parcialmente solapantes, constituye barreras funcionales de permeabilidad selectiva a fármacos. Por tanto, la inhibición selectiva de una de éstas proteínas transportadoras (en nuestro caso Pgp) no debe afectar excesivamente la farmacocinética de los compuestos anticancerosos, y menos aún si en los regímenes de quimioterapia combinada con inhibidores de 3ª generación se escogen citotóxicos que no sean transportados únicamente por Pgp, sino también por algún otro(s) de los transportadores arriba mencionados, cuya funcionalidad no se vea afectada por los moduladores de Pgp.

Los inhibidores de 3ª generación que están actualmente en desarrollo clínico son el ***biricodar* (VX-710)**, el ***tariquidar* (XR9576)** (Mistry P et al., 2001), el ***zosuquidar* (LY335979)** (Dantzig AH et al., 1996), el ***elacridar* (GF120918)** (Hyafil F et al., 1993), el ***laniquidar* (R101933)** (van Zuylen L et al., 2000) y el ***OC144-093*** (Newman MJ et al., 2000).

El ***biricodar* (VX-710)** ha demostrado ser capaz de revertir MDR tanto *in vitro* como *in vivo* vía inhibición de Pgp, y también de MRP1 y BCRP/ABCG2 (Germann UA et al., 1997a; Germann UA et al., 1997b; Minderman H et al., 2004). Los ensayos clínicos preliminares en fase I han mostrado una baja toxicidad intrínseca del compuesto *in vivo* y la ausencia de interacciones farmacocinéticas con doxorubicina (Rowinsky EK et al., 1998) y mitoxantrona (Rago RP et al., 2003), pero sí una reducción de la eliminación de paclitaxel debida, probablemente a que ***biricodar inhibe también a la enzima detoxificante citocromo P450 3A4***, implicada en el metabolismo del paclitaxel (Rowinsky EK et al., 1998). En general, los ensayos clínicos en fase II con biricodar más citotóxicos parecen demostrar que la combinación es aceptablemente tolerada por la mayoría de pacientes en cuanto a toxicidad (Toppmeyer D et al., 2002; Seiden MV et al., 2002; Rago RP et al., 2003), pero los resultados en lo referente a una mejora de la eficacia de los tratamientos son sólo modestos, ya que **no se consigue incrementar la proporción de pacientes que responden a la quimioterapia, aunque entre los que sí**

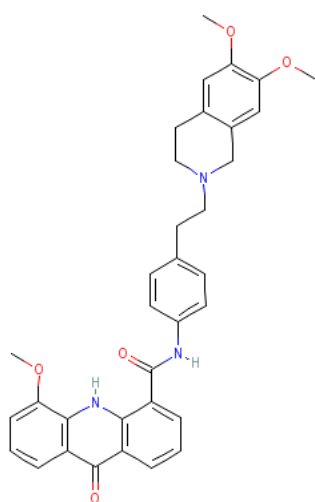
responden se observa un aumento en el tiempo de supervivencia medio después del tratamiento. Más ensayos clínicos están actualmente en curso para establecer definitivamente la utilidad y seguridad del empleo de este modulador MDR en pacientes con diferentes tipos de cáncer.

Tariquidar (XR9576) se une con muy alta afinidad a Pgp e inhibe su actividad de transporte de fármacos de forma no competitiva en el rango nanomolar de concentración (Roe M et al., 1999; Martin C et al., 1999). No ha demostrado tener efectos sobre la farmacocinética de compuestos anticancerosos como paclitaxel, vinorelbina y doxorubicina en pacientes con tumores sólidos (Thomas H y Coley HM, 2003). Sin embargo, los resultados del ensayo clínico de fase II más reciente han sido más bien modestos en lo referente a mejorar la eficacia del tratamiento en pacientes con carcinoma de mama resistente a fármacos (Puztai L et al., 2005). Ensayos clínicos de fase III están en curso para determinar qué clase de pacientes podrían beneficiarse del empleo terapéutico de tariquidar.

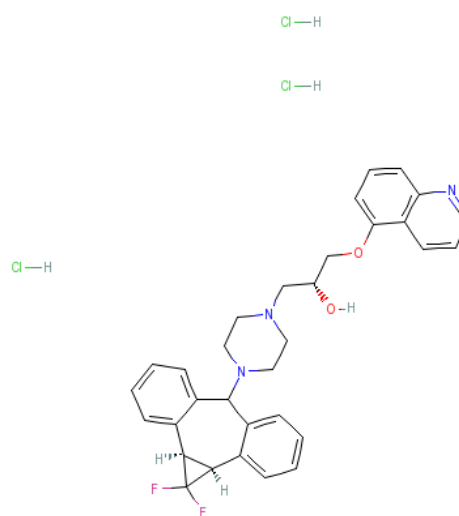
El inhibidor **elacridar** (GF120918) fue seleccionado de entre muchos compuestos análogos según consideraciones teóricas de sus características estructurales (Hyafil F et al., 1993), y ha demostrado ser uno de los inhibidores de Pgp más potentes *in vitro*. También se ha demostrado que es activo contra el transportador **BCRP/ABCG2**, el cual se expresa a menudo en leucemias, aunque a concentraciones mayores de las necesarias para inhibir Pgp en el mismo grado (de Bruin M et al., 1999). Se han completado dos estudios clínicos en fase I con este compuesto que demuestran que no ejerce interacciones farmacocinéticas con doxorubicina (Sparreboom A et al., 1999; Planting AS et al., 2005), pero, hasta donde sabemos, no se ha realizado por el momento ningún otro ensayo clínico orientado a comprobar su eficacia como revertidor de la multirresistencia a fármacos. Sin embargo, su posible uso como potenciador de la absorción por vía oral de los anticancerosos paclitaxel y topotecan sí se ha postulado como una interesante aplicación clínica del elacridar (Kruijtzter CM et al., 2002; Malingre MM et al., 2001).

Zosuquidar (LY335979) es también activo contra Pgp en rango de concentración nanomolar tanto *in vitro* como *in vivo* (Dantzig AH et al., 2001), y no afecta ni a MRP1 ni a BCRP (Shepard RL et al., 2003). Los ensayos clínicos en fase I han

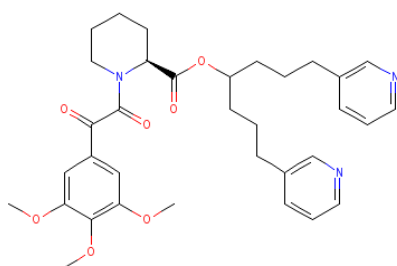
señalado cierto riesgo de neurotoxicidad a dosis elevadas, pero ninguna interacción farmacocinética con doxorubicina (Rubin EH et al., 2002; Sandler A et al., 2004). Los resultados del ensayo en fase III en leucemia mieloide aguda usando zosuquidar en combinación con daunorubicina y citarabina han sido prometedores, lográndose una remisión completa de la enfermedad en 11 de 16 pacientes (Gerrard G et al., 2004), pero no así los de los ensayos en pacientes con tumores sólidos avanzados (Le LH et al., 2005).



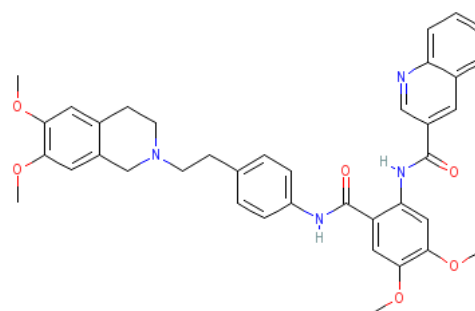
Tariquidar (XR9576)



Zosuquidar (LY335979)



Biricodar (VX-710)



Elacridar (GF120918)

En general, todos estos estudios demuestran que los inhibidores de Pgp de 3ª generación, debido a su especificidad de acción farmacológica, poseen significativas ventajas terapéuticas respecto a los compuestos de 2ª generación. **Pueden ser**

administrados a los pacientes sin necesidad de reducir las dosis normales de fármacos anticancerosos, produciendo interferencias farmacocinéticas mínimas con ellos. Los ensayos clínicos actualmente en curso demostrarán si su empleo supone o no un incremento en los índices de curación y tiempos de supervivencia de los pacientes tratados pues, hasta el momento, tal aspiración aún no ha sido demostrada para ninguno de ellos, aunque existen esperanzas de que así ocurra, al menos con cánceres del tipo de leucemias y linfomas.

VII.3. Razones del fracaso clínico de los inhibidores de Pgp

A pesar de las expectativas que auguran los inhibidores de 3ª generación, y que justifican la continuación de los ensayos clínicos actualmente en curso, parece claro entre los investigadores que **las esperanzas que originalmente se depositaron en los inhibidores de Pgp**, como agentes que revertirían la resistencia a múltiples fármacos en cáncer y que contribuirían a incrementar los índices de curación del cáncer, **no se han satisfecho todavía, ni tan siquiera en un modesto porcentaje de casos** (Robert J y Jarry C, 2003).

La razón de este aparente fracaso va a tener mucho que ver con el hecho de que **la actividad clínica de un revertidor MDR cualquiera va a depender de una serie de condiciones que deben tenerse muy en cuenta cuando se realiza la extrapolación de los resultados *in vitro* a los ensayos clínicos**. Para que la historia hubiese sido otra, y a día de hoy pudiésemos hablar de éxito terapéutico del empleo de inhibidores de Pgp en el tratamiento del cáncer, una serie de **condiciones deberían haberse tenido que cumplir en todos los ensayos clínicos realizados**. Por desgracia, tales condiciones no se satisficieron, o sólo se hicieron en parte:

1) Para empezar, los tumores que van a ser tratados deber ser resistentes a la quimioterapia debido, al menos en una parte significativa, al mecanismo de resistencia que se pretende revertir.

2) La inhibición de Pgp (o de otro transportador MDR) debe ser factible en los tumores *in vivo* sin causar efectos deletéreos en los tejidos sanos que expresan el transportador.

3) Los compuestos usados como revertidores MDR deben carecer de toxicidad intrínseca, ni incrementar la propia de los fármacos anticancerosos por alteraciones de su farmacocinética, dado que esto impediría su empleo seguro en pacientes: la toxicidad asociada a su uso clínico debe estar dentro de los límites aceptables propios de los tratamientos contra el cáncer.

Los fracasos clínicos obtenidos durante el desarrollo de revertidores MDR basados en la inhibición de Pgp se han debido principalmente a que una o varias de estas condiciones no fueron satisfechas.

Los tumores tratados no eran verdaderamente resistentes a la quimioterapia, o no lo eran por mecanismos diferentes a la expresión de Pgp

Los primeros ensayos clínicos con inhibidores de Pgp se realizaron con pacientes refractarios a la quimioterapia, que generalmente ya habían recibido tratamiento con éxito 6 meses antes de experimentar relapso. Es bien sabido que volver a tratar a pacientes varios meses después del fracaso de la terapia puede "rescatar" a un porcentaje de los mismos y provocar respuestas terapéuticas al tratamiento (Robert J y Jarry C, 2003). Sin embargo, **el relapso de la enfermedad no es prueba clínica de la existencia de una resistencia a la terapia empleada**, por lo que, en estos ensayos, **nunca existieron pruebas de estar tratando pacientes con tumores verdaderamente resistentes**. De haberse comprobado realmente tal cosa, se podría haber demostrado si la nueva terapia con revertidor combinado provocaba o no una modificación en la respuesta de los tumores.

El problema fundamental radicaba en diagnosticar la existencia real de un fenotipo MDR en un tumor dado pues, en la época de estos primeros ensayos, tal diagnóstico era muy difícil debido a la **falta de consenso entre grupos de investigación sobre lo que era un fenotipo MDR**. Por lo tanto, la ausencia de un criterio estandarizado que permitiese determinar de forma creíble la existencia de

un fenotipo MDR impedía comparar los resultados de los diferentes laboratorios, y poder así extraer conclusiones de ellos (Beck WT et al., 1996).

Cuando ya se tiene claro que el agente revertidor de MDR está siendo testado en un tumor verdaderamente resistente a fármacos (a menudo por la sobre-expresión de Pgp), la cuestión que surge es la de **si el mecanismo de resistencia del tumor es único, o si coexisten más de uno**. Éste no tiene por qué ser siempre el caso, ya que se reportan cada vez más a menudo casos de tumores en los que coexisten varios mecanismos que contribuyen a la MDR (Longley DB y Johnston PG, 2005). Teniendo en cuenta esto, **los agentes inhibidores de Pgp deben ser testados solamente en aquellos cánceres en los que la resistencia esté mediada única, o al menos fundamentalmente, por Pgp**. Por ello, definir el mecanismo causante del fenotipo MDR de un tumor dado debe ser un paso previo antes de aplicar terapia combinada alguna con inhibidores de Pgp. Este podría ser el caso de los cánceres de ovario (Yuen AR y Sikic BI, 1994) y de los cánceres hematológicos como los linfomas no de Hodgkin (Kao CH et al., 2001) y la leucemia mieloide aguda (Leith CP et al., 1999), donde es claro que la expresión de Pgp está detrás del fenómeno MDR.

La inhibición de Pgp debe ser factible *in vivo* sin efectos deletéreos para los tejidos normales que expresan el transportador

La eficacia de los revertidores MDR está bien documentada en modelos *in vitro*, pero las condiciones en tales modelos no tienen por qué reproducir fielmente aquellas que existen *in vivo*. Por ejemplo, los cultivos celulares suelen crearse en presencia de un 10% de suero bovino fetal, lo que representa sólo el 10% del contenido de proteínas séricas en comparación con las condiciones *in vivo*. Como consecuencia, la unión de fármacos a proteínas séricas es muy diferente y la fracción de fármaco libre y unido a proteínas puede ser muy distinta entre las situaciones *in vitro* e *in vivo*. Se desconoce si la unión a proteínas séricas es un factor determinante de la actividad de los inhibidores de Pgp, pero si lo fuera, el comportamiento de estos compuestos *in vivo* no podría predecirse sólo a partir de los experimentos *in vitro*. Los estudios con tumores MDR humanos transplantados a animales de

laboratorio han demostrado que **sólo un escaso número de los inhibidores de Pgp que funcionan *in vitro* consiguen revertir el fenotipo MDR *in vivo***. Tal demostración en modelos animales parece, pues, deseable antes de embarcarse en la realización de costosos ensayos clínicos en pacientes reales, para no perder el tiempo con compuestos que, aunque prometedores *in vitro*, pueden no funcionar *in vivo*.

También **debe comprobarse que el agente revertidor no tiene efectos perjudiciales para los tejidos que expresan Pgp de manera fisiológica**. Puesto que Pgp cumple no sólo funciones de detoxificación del organismo, sino también de protección de órganos potencialmente hipersensibles a los efectos tóxicos de fármacos (sistema nervioso central, células germinales, feto), la posibilidad de bloquear la Pgp fisiológica además de la del tumor parece representar un serio peligro si tenemos en cuenta que los inhibidores se coadministran con fármacos anticancerosos, que son en potencia neurotóxicos y seguro citotóxicos contra células en activa división como las germinales y las células madre de la médula ósea. Además, la inhibición de la Pgp en hígado y riñón puede causar alteraciones en la eliminación de fármacos, lo que incrementa la toxicidad del tratamiento anticanceroso. Por lo tanto, **la ventana terapéutica para el uso de inhibidores de Pgp como revertidores del MDR de tumores es muy estrecha**.

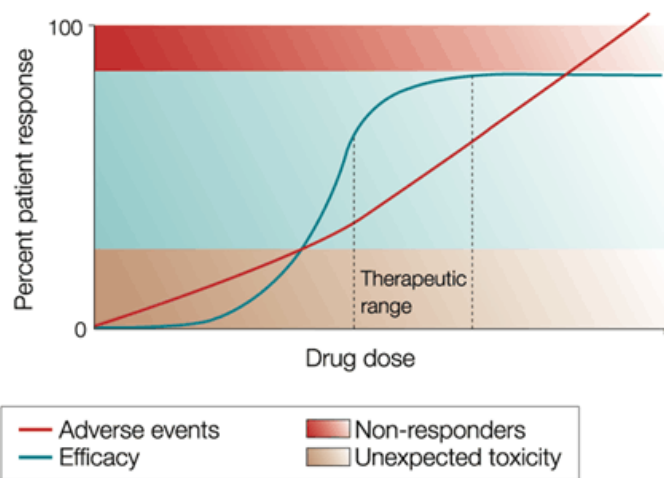


Figura 34: ventana terapéutica para el empleo de fármacos citotóxicos contra el cáncer, dentro de la cual deben funcionar los inhibidores de Pgp.

Los compuestos usados como revertidores MDR deben carecer de toxicidad intrínseca

Esta importante condición ha sido **tenida muy en cuenta por las industrias farmacéuticas** que han invertido en el desarrollo de tales compuestos, lo que ha rendido moléculas con toxicidad intrínseca muy baja, aunque no del todo carentes de ella. Los requerimientos de elevada eficacia terapéutica y absoluta ausencia de toxicidad intrínseca de los ensayos clínicos más recientes han puesto el listón tan alto para la identificación de compuestos clínicamente útiles, que muchos de ellos, aún de 3ª generación y muy prometedores, no han seguido siendo investigados. Algunos investigadores piensan que **tales exigencias clínicas son demasiado altas** (Robert y Jarry, 2003), pues al tratarse de una enfermedad como el cáncer, en la que el efecto positivo de una terapia se mide en términos de supervivencia en meses, **se debería aceptar cierto grado de toxicidad intrínseca de algunos revertidores MDR si con ello se consigue un incremento real de la supervivencia de los pacientes tratados**. Sin embargo, la exigencia de absoluta carencia de toxicidad parece persistir, lo que explica que **apenas una tríada de inhibidores de 3ª generación haya entrado en la fase III de ensayos clínicos**, y que todavía ninguno de ellos haya sido aprobado para uso clínico rutinario ni esté por serlo. Es un hecho desafortunado, pues parece posible que **algunos compuestos valiosos podrían estar siendo ya aplicados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer si existiera un mejor entendimiento entre los criterios de los oncólogos, los farmacólogos y de la propia industria farmacéutica** en relación con lo que debe ser un revertidor MDR clínicamente útil y de uso aceptablemente seguro.

VII.4. Nuevas estrategias para el empleo clínico de inhibidores de Pgp con éxito

Después de más de una década de investigación, parece claro que **la resistencia a fármacos, una vez establecida en los tumores, es multifactorial y no se puede atribuir exclusivamente a Pgp**. Parece también

claro que **el diseño experimental de los ensayos clínicos debe ser cambiado**. Con algunas excepciones, se han intentado siempre tratar los tumores con antagonistas de Pgp sólo después de que tales tumores han sido repetidamente expuestos a agentes anticancerosos, lo que es una **estrategia ruinosa** comparable a la de un general que espere para atacar a que el enemigo se arme y fortifique.

En lugar de esto, algunos investigadores argumentan que la probabilidad de éxito de una estrategia encaminada a **prevenir la aparición de la resistencia a fármacos en tumores, en lugar de a revertirla**, sería mucho mayor (Bates SE, 1999). Varias evidencias apoyan esta suposición: entre ellas, la demostración de que la expresión del gen *MDR1* puede ser inducida de forma aguda en cuestión de minutos en tumores tras exponerlos a doxorubicina (Abolhoda et al., 1999). La inducción de Pgp durante el tratamiento podría proporcionar una disminución suficiente de la acumulación intracelular de anticancerosos como para que las células del tumor puedan resistir la quimioterapia, dotándolas de ventaja selectiva suficiente para sobrevivir y repoblar un tumor que, en principio, es sensible al tratamiento.

La primera línea de evidencias que sugiere que **la prevención de la aparición de multirresistencia a fármacos, más que su reversión una vez establecida, debe ser el objetivo de los estudios con antagonistas de Pgp** viene de los modelos de tumores en laboratorio, con los que se ha demostrado una significativa ventaja al añadir un inhibidor de Pgp durante la exposición inicial de las células cancerosas a la quimioterapia. Mediante análisis del índice de aparición de mutantes, se ha reportado **una reducción de 10 veces en la emergencia de clones resistentes** de células MES-SA de sarcoma humano expuestas a doxorubicina en presencia del inhibidor de Pgp PSC 833 (valsopodar). En contrapartida, el tratamiento sólo con doxorubicina resultaba en la selección de mutantes espontáneos Pgp⁺ resistentes a fármacos con un ratio de $1,8 \times 10^{-6}$ por generación. En presencia de PSC 833, en cambio, los mutantes resistentes aparecían con una frecuencia de sólo 2.5×10^{-7} por generación, y manifestaban una expresión disminuida de topoisomerasa II α como mecanismo de resistencia, en lugar de sobre-expresar Pgp (Beketic-Oreskovic L et al., 1995). Este dato apoya claramente el **uso de antagonistas de Pgp desde las fases iniciales del tratamiento del cáncer**,

para reducir así la frecuencia de aparición de clones resistentes a fármacos.

Una segunda línea de evidencia ha resultado de un ensayo clínico (South West Oncology Group Trial) en pacientes de leucemia mieloide aguda con un pobre pronóstico de curación de la enfermedad. En tal ensayo, de entre 226 pacientes tratados con quimioterapia clásica se escogieron al azar dos grupos: uno al que se le coadministró el inhibidor de Pgp *ciclosporina A*, y otro al que no se le coadministró nada (List AF et al., 1998 Blood, sólo Abstract). Aunque la proporción de pacientes que respondían al tratamiento no se incrementó significativamente (40% *versus* 33%), **la supervivencia sin relapso después de 3 años desde la aparente curación clínica sí mejoró más de 4 veces (43% *versus* 10%; P= 0.033) en los pacientes tratados con ciclosporina A.** Parece obvio que estimar la eficacia de un tratamiento en función de la proporción de pacientes que responden al mismo es un error, y que lo interesante debería ser estimar tal eficacia en función del número de pacientes que, tras responder al tratamiento, no reproducen la enfermedad, pues **lo que interesa es librar al paciente de la enfermedad para siempre, y no curarlo hoy y que vuelva a recaer sin solución de tratamiento posible al cabo de poco tiempo.** Para los pacientes de cáncer de mama, de ovario, y para las leucemias y linfomas, los índices de respuesta al tratamiento son ya bastante altos y parece difícil que puedan incrementarse mucho más con los tratamientos clásicos. Sin embargo, una proporción muy importante de los pacientes de estos cánceres reproduce la enfermedad, a menudo de manera intratable. **La prevención de la emergencia de resistencias, medida por la prolongación de la supervivencia después de la curación y por la disminución del índice de relapso, debe ser el objetivo de los estudios con moduladores de Pgp.**

El motivo por el que los inhibidores de Pgp no parecen incrementar el porcentaje de pacientes que responden inicialmente al tratamiento, pero sí aumentan la proporción de los que no reproducen la enfermedad entre los que sí responden, podría explicarse a nivel molecular de la siguiente manera:

Como ya expusimos en un apartado anterior, **los tumores son inherentemente muy heterogéneos**, al estar formados por millones de células

que, al presentar muchas de ellas un **“fenotipo mutador”**. Este fenotipo es resultante de tener alterados los mecanismos celulares que normalmente velan por la integridad del genoma y reparar los errores del ADN antes de cada división celular, y las células en estas circunstancias **acumulan múltiples mutaciones a un ritmo exponencial respecto de la célula madre originaria del tumor**. Como consecuencia de esto, cuanto más tiempo pasa hasta que el tumor se descubre y se trata, la probabilidad de que las células del tumor hayan evolucionado hasta un estado más malignizado es mayor, acumulado múltiples defectos relacionados con el desarrollo de multirresistencia a fármacos, invasividad y metástasis, etc. De ahí la **importancia de la detección precoz de los tumores**, y la explicación de por qué **la expectativa de curación de un cáncer es directamente proporcional a la prontitud de su detección**. También hemos visto que, en muchos cánceres, la sobre-expresión aguda, primero, y luego constitutiva de Pgp, es uno de los primeros mecanismos de resistencia que desarrollan los tumores. Pero también sabemos que no es el único mecanismo con que las células tumorales cuentan para defenderse de la agresión que representa la quimioterapia, y **si se les deja el tiempo suficiente, pueden acumular varios mecanismos de resistencia además de la expresión de Pgp**.

El hecho de que, para un tipo de cáncer determinado y una quimioterapia concreta, el porcentaje de pacientes que responden al tratamiento es más o menos fijo y nunca es del 100% puede deberse, por un lado, a que incluso **pacientes diagnosticados todos ellos para un mismo tipo de cáncer pueden en realidad padecer enfermedades tumorales sutilmente diferentes, con expectativas de respuesta distintas**. Pero también se debe al hecho de que, dando por sentado que todos ellos tengan exactamente el mismo tipo de cáncer, no todos ellos acuden al oncólogo con un tumor en la misma fase de su evolución maligna. **El porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento** serían aquellos en los que el tumor ha llegado a ser ya tan maligno, que **puede haber acumulado ya mecanismos más tardíos de resistencia a fármacos**, que son aquellos que invalidan absolutamente toda eficacia de la quimioterapia convencional, como es el **fallo en la inducción de apoptosis** (Igney FH y Krammer PH, 2002).

Para tales pacientes, el uso de inhibidores de Pgp es inútil en cuanto a esperar mejorar la respuesta a la quimioterapia, pues **la inhibición de la apoptosis hace a las células tumorales insensibles a la acción de citotóxicos independientemente de su grado de acumulación intracelular**, lo que explica que el uso de inhibidores de Pgp no incremente la proporción de pacientes de cáncer que responden al tratamiento. Para pacientes con cánceres muy avanzados en su evolución malignizante, sólo estrategias encaminadas a reactivar la apoptosis podrían tener alguna esperanza de éxito (Shabbits JA et al., 2003).

Pero volviendo a los pacientes que sí responden a la terapia convencional, lo intrigante en este caso es que, de todos ellos, haya un porcentaje amplio que, a pesar de estar aparentemente curados, sufren relapso con reproducción de los tumores tras un tiempo. Pero lo peor es que **estos nuevos tumores ya presentan fenotipo MDR y no son tratables con la terapia que originalmente sí consiguió respuesta terapéutica**. El hecho de que los inhibidores de Pgp consigan incrementar el porcentaje de pacientes que se curan y no experimentan relapso se explicaría porque, aparentemente, **el porcentaje de pacientes en los que sus tumores albergan ya células resistentes Pgp⁺ desde el inicio es muy alto**. Como consecuencia, la quimioterapia al principio es capaz de reducir el tumor hasta ser clínicamente indetectable, porque consigue eliminar la inmensa mayoría de sus células, sensibles a fármacos. En cambio, las pocas células Pgp⁺ del tumor pueden sobrevivir a la quimioterapia y reproducir el tumor al cabo de cierto tiempo, dando origen a nuevo tumor en el que todas sus células serán Pgp⁺ y, por ello, insensibles a una nueva ronda de tratamiento. **El empleo, desde el comienzo del tratamiento, de inhibidores de Pgp eliminaría la ventaja de supervivencia que poseen las células Pgp⁺ respecto de sus hermanas sensibles a fármacos**, mayoritarias en el tumor. Y carentes así de toda ventaja, células Pgp⁺ y Pgp⁻ serían eliminadas por igual por los fármacos anticancerosos, no dejando supervivientes que puedan reproducir la enfermedad.

VIII. DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA GLICOPROTEÍNA-P

En los últimos 10-15 años los paradigmas de la investigación en el diseño de fármacos han cambiado significativamente, desarrollándose nuevas tecnologías en casi todos los campos relacionados. La biología molecular, los bioensayos automatizados y el rápido avance de la química combinatoria han convergido dando origen a los **programas HTS (*High-throughput screening*)**, los cuales son la última estrategia para el descubrimiento de nuevos fármacos. Prácticamente todas las compañías farmacéuticas del mundo han establecido estos programas como una parte integral del proceso de investigación en nuevos fármacos. De esta forma, en muy poco tiempo, se está estudiando la actividad de un número enorme de compuestos frente a un creciente número de dianas moleculares de interés terapéutico (van de Waterbeemd H y Gifford E, 2003). Los transportadores de múltiples fármacos se encuentran entre las dianas terapéuticas más atractivas para el desarrollo de fármacos por parte de las industrias farmacéuticas, con especial énfasis en el mejor estudiado de todos ellos (la Pgp MDR1).

De los numerosos estudios que han intentado relacionar cualitativamente la estructura y propiedades fisicoquímicas de los compuestos con su capacidad para modular la actividad de Pgp, solamente se han conseguido definir una serie de requerimientos físicoquímicos generales (Wiese M y Pajeva IK, 2001): **deben ser moléculas hidrofóbicas, anfipáticas, muchas de ellas bases débiles parcialmente ionizadas a pH fisiológico, con tamaños moleculares de más de 250 y no mucho más de 1000-2000, y fundamentalmente aceptores de puentes de hidrógeno**. Sin embargo, son tan diversas las moléculas que satisfacen estos requerimientos fisicoquímicos, y que funcionan como moduladores de Pgp, que **no se ha conseguido identificar ningún elemento estructural común a todos ellos**, tales como la presencia sustituyentes monoatómicos o grupos funcionales específicos, ni tampoco subestructuras moleculares mayores. A lo sumo,

se ha reconocido en muchos de ellos la existencia de **anillos aromáticos coplanares y grupos amino terciarios básicos**, pero ni siquiera esto es universal a todos los inhibidores de Pgp.

VIII.1. Múltiples sitios de unión de fármacos en la Pgp para transporte y modulación

Uno de los factores fundamentales para el diseño de inhibidores de Pgp es la identificación de los sitios de unión de fármacos de la proteína. Esto no ha sido una tarea fácil en absoluto, pues **Pgp no posee un sitio activo simple y bien definido que pueda ser fácilmente modelizado**. Tres dificultades fundamentales han surgido cuando se han pretendido caracterizar los sitios de unión de fármacos de Pgp:

1) Pgp es una proteína integral de la membrana plasmática, fuertemente embebida en ella, y **muy difícil de purificar en las cantidades suficientes para los estudios de cristalización**. 2) Pgp posee una **especificidad amplísima de reconocimiento y transporte de sustratos** y, en muchos casos, no está nada claro si un modulador dado de Pgp es o no transportado por ella. 3) Pgp también es una ATPasa, y **las moléculas que interfieren con la unión e hidrólisis del ATP pueden presentar también propiedades moduladoras de la proteína**, en virtud del acoplamiento existente entre las actividades ATPasa y de transporte de sustratos.

Por todo esto, la enorme dificultad para definir características comunes a todos los compuestos que interaccionan con Pgp, y que permitirían establecer pautas en el diseño racional de inhibidores más potentes del transportador, hace que tal diseño racional de inhibidores siga suponiendo, aún a día de hoy, un tremendo reto.

A pesar de todo, se han desarrollado dos aproximaciones para intentar tal diseño racional: una basada en **definir los sitios de unión de fármacos** a partir de los datos estructurales de la proteína, y otra que intenta establecer **relaciones de estructura-actividad** entre los distintos sustratos/moduladores de Pgp para definir el **farmacóforo** del transportador, esto es, el conjunto de características

fisicoquímicas y estructurales que define a los ligandos que establecen una interacción óptima con Pgp.

VIII.2. Sitios de unión de fármacos en Pgp: aproximación basada en el receptor

Los dominios transmembrana (TMD) de Pgp desempeñan un papel crítico en el reconocimiento y transporte de fármacos. Estudios de mutagénesis han demostrado que sustituciones aminoacídicas en posiciones precisas de los TMDs alteran dramáticamente la especificidad de sustrato de Pgp (Ambudkar SV, et al., 1999; **Figura 33**). El sitio o sitios de unión de fármacos parece, pues, estar efectivamente formado por los segmentos transmembrana de la proteína, y especialmente, pero no exclusivamente, por los TM4-6 y TM11-12 (Loo TW y Clarke DM, 2000b; Loo TW y Clarke DM, 2002), y la interfase entre ellos constituye un bolsillo de unión de fármacos (**Figura 35**).

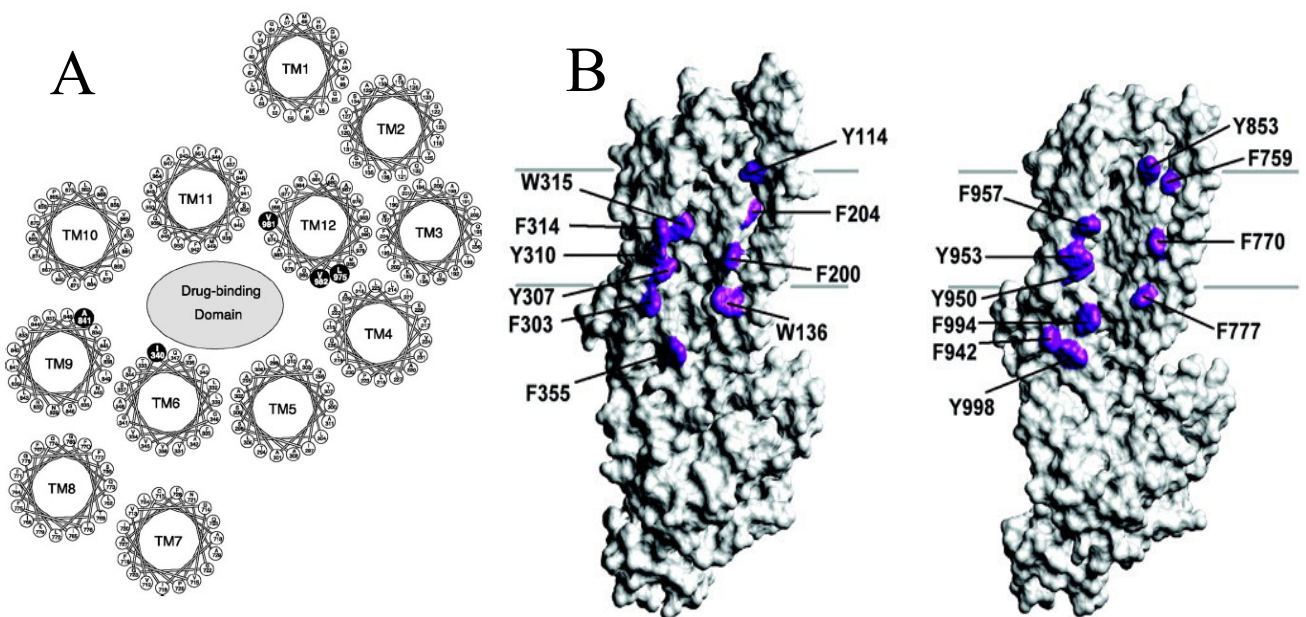


Figura 35: **A)** segmentos transmembrana de la Pgp que parecen definir el gran bolsillo hidrofóbico de unión de fármacos, y **B)** modelo tridimensional de tal bolsillo hidrofóbico en los que se destacan en azul los aminoácidos que parecen contribuir a la unión de sustratos. Mutaciones en estas posiciones alteran marcadamente la especificidad de sustratos del transportador.

La existencia de uno o varios sitios de unión es todavía materia de controversia. La interacción entre dos sustratos típicos de Pgp, Hoechst 33342 y rodamina 123, permitió concluir la existencia de **2 sitios de unión de fármacos, H y R** (Shapiro AB y Ling V, 1997), caracterizados por el reconocimiento específico de cada uno de ambos compuestos. Un **tercer sitio de unión para prazosina y progesterona**, que no mediaría transporte pero sí interaccionaría alostéricamente con los otros dos, ha sido también hipotetizado por el mismo grupo (Shapiro AB et al., 1999). Otro grupo también ha caracterizado dos sitios de unión de fármacos en Pgp: el primero uniría verapamil, ciclosporina A y actinomicina D, mientras que el segundo uniría vinblastina (Pascaud C et al., 1998).

Sin embargo, **independientemente de su número o especificidad, los sitios de unión de fármacos de Pgp son claramente solapantes**: exclusiones mutuas que resultarían de impedimentos estéricos causados por este solapamiento físico darían cuenta de las uniones competitivas observadas entre algunos moduladores. En otras palabras, pueden ocurrir interacciones entre fármacos que se unen a sitios diferentes debido al tamaño de las moléculas, compitiendo las moléculas mayores con mayor número de otras moléculas, y pudiendo dos moléculas diferentes unirse simultáneamente a Pgp si son lo suficientemente pequeñas como para no estorbarse mutuamente (Garrigues A et al., 2002). Esta visión de los sitios de unión solapantes en Pgp no es contradictoria con **el modelo que parece gozar de más credibilidad hasta la fecha**, el cual **describe las interacciones entre Pgp y sus ligandos en el ámbito de un único gran sitio de unión poliespecífico, en el que cada molécula acomodaría su propia unión a la proteína interaccionando con una porción diferente del canal transmembrana delimitado por los TMDs** (Loo TW y Clarke DM, 2001; Loo TW y Clarke DM, 2002; **Figura 37**). De hecho, **cada ligando "crearía" su propio sitio de unión usando una combinación de residuos de diferentes segmentos transmembrana para estabilizar su unión**. Esto sería posible por la movilidad y flexibilidad intrínseca que se ha demostrado que tienen los segmentos transmembrana de Pgp (Loo TW y Clarke DM, 2000a; 2000c). **Serían posibles múltiples combinaciones de residuos, lo que explicaría cómo Pgp puede**

unir tantas moléculas diferentes y por qué la afinidad de cada sustrato por la proteína es diferente.

Este conocimiento de la naturaleza de los sitios de unión de fármacos de Pgp puede ser utilizado para el diseño de nuevos moduladores.

VIII.3. Relaciones de estructura-actividad entre moduladores de Pgp: aproximación basada en los ligandos

Puesto que los estudios cualitativos preliminares, para determinar las características estructurales compartidas por todos los sustratos/moduladores de Pgp, sólo ofrecieron conclusiones muy generales sobre la naturaleza fisicoquímica de estas moléculas, se ha hecho necesaria otra aproximación al diseño racional de inhibidores de Pgp.

Las relaciones entre la estructura de los ligandos que se unen a Pgp (sustratos o inhibidores) y sus respectivas actividades inhibitorias se han comprendido mejor a raíz de la aplicación de las **metodologías QSAR (*quantitative structure-activity relationships*)** y de la **modelización de farmacóforos**.

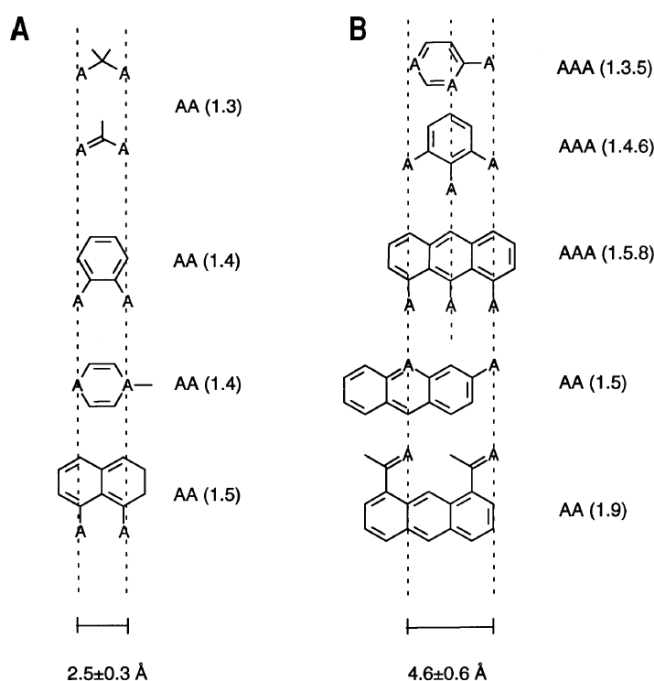


Figura 36: Patrones de organización de grupos donadores de electrones observados en muchos sustratos de Pgp. **A)** Unidades funcionales de **tipo I** y **B)** Unidades funcionales de **tipo II**. "A" representa un grupo aceptor de puentes de hidrógeno (o donador de electrones, que es lo mismo), y los números entre paréntesis significan el primer y el n-ésimo átomo con un par electrónico libre.

Estas aproximaciones sí han permitido identificar elementos estructurales comunes bien definidos y aparentemente necesarios para una interacción efectiva de los ligandos con Pgp. Estos elementos estructurales, o **"unidades funcionales"**, consisten en grupos aceptores de puentes de hidrógeno (o donadores de electrones) organizados en la molécula de modulador con una separación espacial precisa (Seelig A, 1998; Seelig A y Landwojtowicz E, 2000; **Figura 36**). Así, los autores de estos trabajos sugieren que la potencia moduladora de Pgp depende del número y fuerza de tales unidades funcionales a la hora de establecer puentes de hidrógeno con el sitio de unión de fármacos de Pgp. De hecho, **los dominios transmembrana de la proteína contienen numerosos aminoácidos con cadenas laterales donadoras de puentes de hidrógeno, especialmente los segmentos transmembrana TM4-6 y TM11-12** (Seelig A y Landwojtowicz E, 2000), que son precisamente aquellos que se han demostrado sobradamente implicados en la unión y transporte de fármacos (Loo TW y Clarke DM, 2000b; Loo TW y Clarke DM, 2002; Safa AR, 2004; **Figura 33 y 45**). Sin embargo, estos modelos preliminares no tenían en cuenta la direccionalidad de los puentes de hidrógeno, ni la flexibilidad conformacional de ciertos compuestos.

Las propiedades de ser un sustrato transportable por Pgp, o bien un inhibidor de la proteína apenas si se pueden separar para la mayoría de compuestos que interaccionan con este transportador. Algunos investigadores, a pesar de todo, han sido capaces de establecer criterios para discriminar a priori entre unos y otros (Scala S et al., 1997; Wang YH et al., 2005), encontrando que **las moléculas mejor transportadas suelen ser pobres inhibidores y viceversa**. El modelo QSAR antes descrito (Seelig A y Landwojtowicz E, 2000) podría explicar este fenómeno, considerando el hecho de que el número de grupos en una molécula que son capaces de establecer interacciones con el sitio de unión de Pgp va a determinar la fortaleza de la unión: **un alto potencial para formar puentes de hidrógeno se correspondería con una elevada potencia inhibitoria**, mientras que un potencial bajo para formar tales interacciones se correspondería con unas

propiedades inhibitorias más débiles, propias de moléculas más fácilmente transportables a través del canal formado por los dominios transmembrana de Pgp.

Se han propuesto también otros modelos QSAR, cada uno de los cuales aportando su granito de arena al esclarecimiento del complejo rompecabezas de la definición del farmacóforo de Pgp (Klopman G et al., 1997; Bakken GA y Jurs PC, 2000; Ekins S et al., 2002; Pajeva IK y Wiese M, 2002; Wang RB et al., 2003; Cortés-Selva F et al., 2004; Dearden JC et al., 2003; Gombar VK et al., 2004; Cianchetta G et al., 2005), y que han demostrado ser bastante precisos a la hora de predecir si un compuesto es o no un sustrato de Pgp, o incluso la potencia inhibitoria de Pgp de compuestos aún no testados.

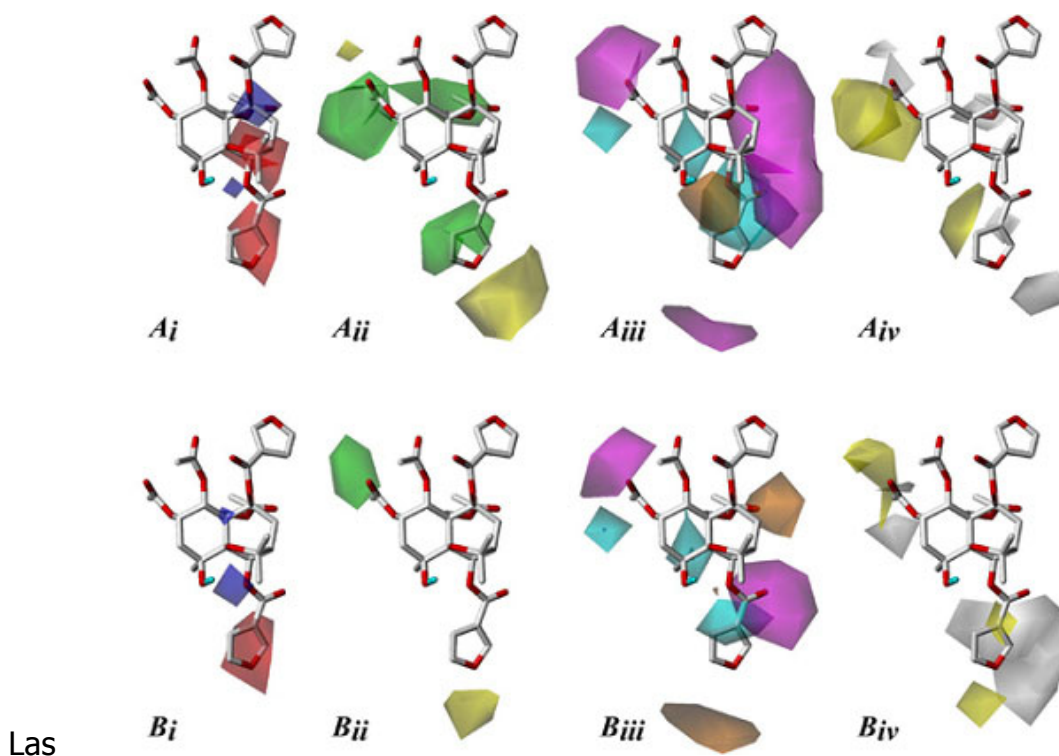


Figura 37: modelo **ComSIA™** de la interacción de sesquiterpenos de Celastraceae con la Pgp del protozoo parásito *Leishmania tropica*. ComSIA™ es una metodología QSAR basada en la asunción de que cambios en la afinidad de los ligandos están relacionadas con cambios en las propiedades moleculares, denominadas estas últimas como "campos". Los campos considerados son 5: estérico, electrostático, hidrofóbico, aceptor de puentes de hidrógeno y donador de puentes de hidrógeno. El resultado es un grupo de áreas coloreadas que muestran qué partes de la molécula de ligando interaccionan favorablemente (o desfavorablemente) con el ambiente que la rodea. Tomado de Cortés-Selva F et al. (2004).

conclusiones que se extraen de estos estudios de modelización molecular de ligandos no son distintas de aquellas procedentes de los estudios basados en la propia estructura de la proteína: **los sitios de unión de fármacos de Pgp tienen varias regiones que pueden participar en interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno, y compuestos diferentes pueden interaccionar con regiones de unión diferentes.**

La amplia especificidad de reconocimiento de sustratos de Pgp se entiende ahora mucho mejor a la luz de las aproximaciones complementarias orientadas a esclarecer, por una parte, la estructura del sitio(s) de unión de fármacos y, por otra, las características estructurales comunes de sus múltiples ligandos. **Disponemos ya, por tanto, de las herramientas necesarias para rastrear compuestos por su potencial para inhibir Pgp y diseñar nuevos fármacos con las propiedades inhibitorias deseadas.**

VIII.4. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos: Una nueva familia de revertidores MDR de origen natural

Los productos naturales juegan un importante papel en el descubrimiento de nuevos fármacos y en la química biológica. De hecho, muchos de los nuevos fármacos candidatos que se aprueban para uso clínico proceden de fuentes naturales, y son las plantas el origen de más de un tercio de ellos. Además, los productos naturales se han empleado extensivamente para la elucidación de mecanismos celulares complejos, incluyendo sistemas de transducción de señales y de regulación del ciclo celular, dando lugar a la identificación de importantes dianas celulares con potencial interés terapéutico.

La familia *Celastraceae*

De entre las familias de plantas reconocidas como fuente importante de metabolitos para uso farmacológico, la **familia *Celastraceae*** está cobrando especial importancia. Conocida como la "familia agridulce", está constituida por **88 géneros y 1300 especies** (Spivey AC et al., 2002), siendo los géneros *Maytenus* (255 especies), *Euonymus* (200 especies), *Cassine* (40 especies) y *Celastrus* (30

especies) los más representativos (Heywood VH, Flowering Plants of the World. 1993, Oxford University Press, New York; Woodland DW, Contemporary Plant Systematics. 1991, Prentice-Hall, New Jersey). Las *Celastraceae* se distribuyen principalmente en las **regiones tropicales y subtropicales del planeta, y en menor proporción en las regiones templadas**, en forma de pequeños árboles, arbustos y lianas, leñosos y ramificados.

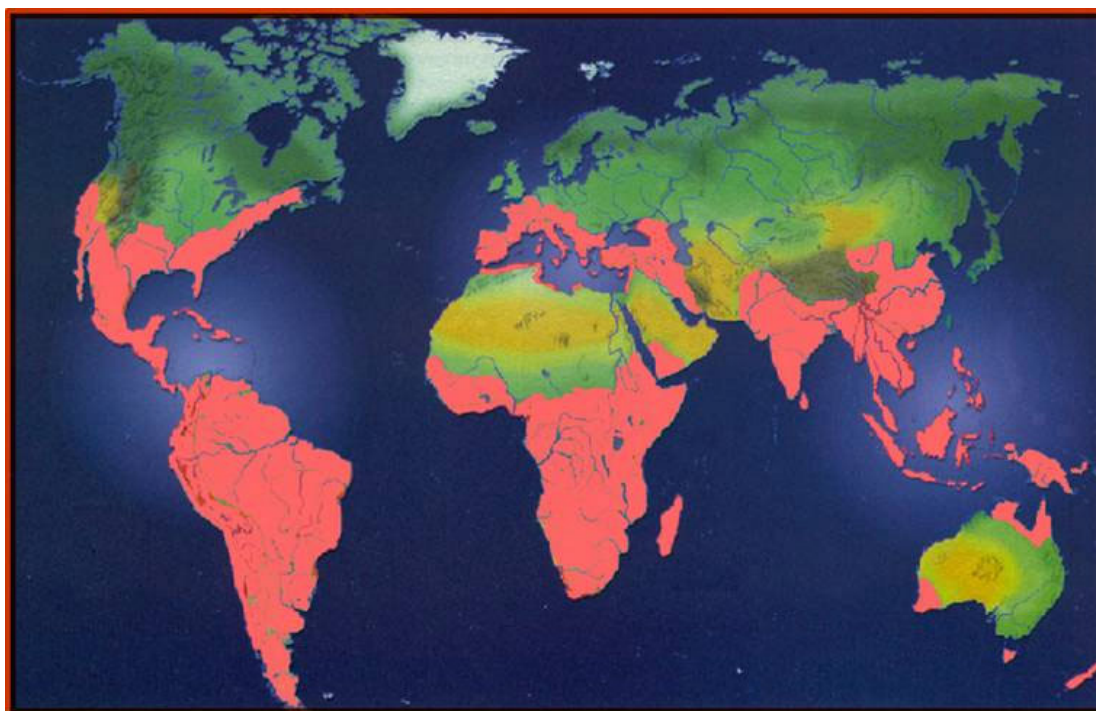


Figura 38: Distribución geográfica de la familia Celastraceae (en **rojo**).

Numerosas especies de esta familia se han usado a lo largo de siglos en agricultura y medicina tradicional -especialmente en Asia y Latinoamérica- por sus propiedades insecticidas y repelentes de insectos y plagas agrícolas, estimulantes, tranquilizantes, supresoras del apetito, sedantes, eméticas, antipiréticas, purgantes, abortivas, antitumorales, antibacterianas, para restaurar la memoria y en el tratamiento de heridas por flechas envenenadas, entre otras (González AG et al., Studies in Natural Products Chemistry, 23: 649-738, 2000).

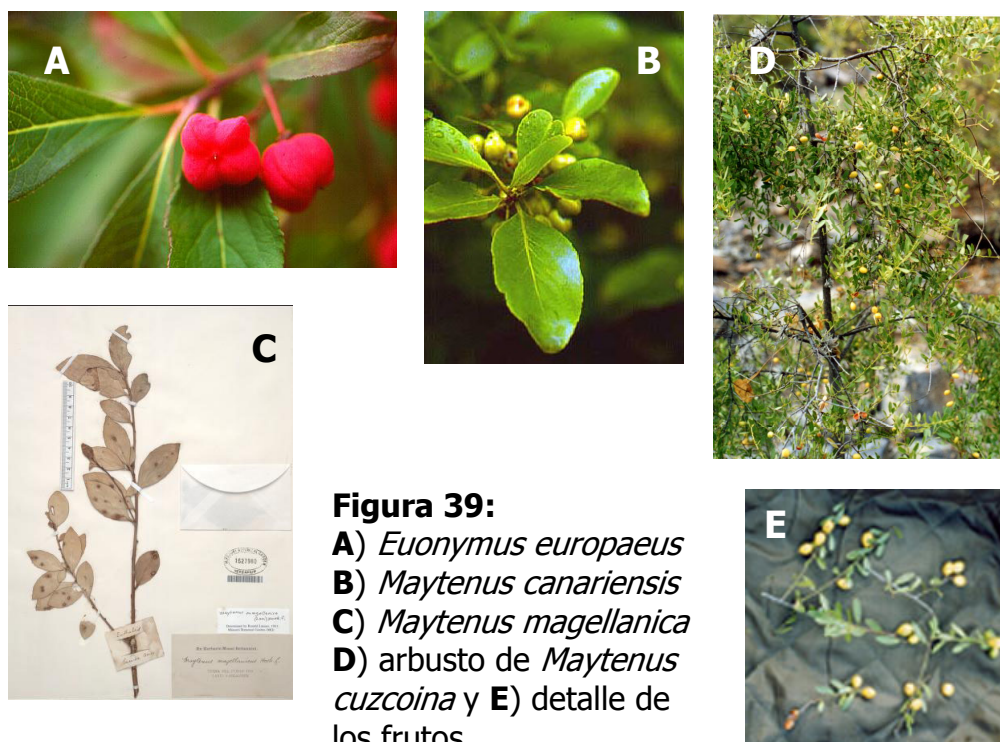


Figura 39:
A) *Euonymus europaeus*
B) *Maytenus canariensis*
C) *Maytenus magellanica*
D) arbusto de *Maytenus cuzcoina* y **E)** detalle de los frutos.

Metabolitos bioactivos de la familia *Celastraceae*: sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos

Desde la identificación, en la década de los 70, de los compuestos maytansinoides de *Celastraceae* como potentes antitumorales (Kupchan SM et al., 1972), numerosos laboratorios han investigado intensamente esta familia de plantas, interesados por su amplia y variada distribución botánica, por la naturaleza química de sus metabolitos secundarios, la complejidad de los procesos biogénicos que los producen y, sobre todo, por la **enorme variedad de acciones farmacológicas que despliegan los preparados de sus constituyentes químicos**.

Durante los últimos 30 años se ha aislado de *Celastraceae* un enorme número de metabolitos secundarios, siendo los **sesquiterpenos** los más característicos de esta familia. Derivados del isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) con **15 átomos de carbono**, todos ellos están basados en un esqueleto C_{15} tricíclico conocido como **dihidro- β -agarofurano [5,11-epoxy-5 β , 10 α -eusdesm-4(14)-eno]**, y se consideran **indicadores quimiotaxonómicos de la familia (Figura 45)**. Este esqueleto tricíclico se aísla polihidroxilado y, a su vez, poliesterificado en mayor o

menor medida con ácidos alifáticos o aromáticos, que van desde el ácido acético o ácidos heterocíclicos, como el furanoico, hasta ácidos dicarboxílicos que forman un puente macrodilactona entre las posiciones C-3 y C-13 y/o C-8 y C-14, dando lo que se conoce como sesquiterpenos alcaloídicos. Los datos de rayos-X y los estudios conformacionales usando procedimientos de mecánica molecular muestran que los anillos A y B transfusionados forman un sistema trans silla-silla decalino, ligeramente distorsionado por la presencia del enlace 1,3-diaxial que forma el anillo C tetrahidrofurano, prácticamente perpendicular al plano formado por los carbonos C-5, C-7, C-8 y C-10 (**Figura 40**) (Spivey AC et al., 2002).

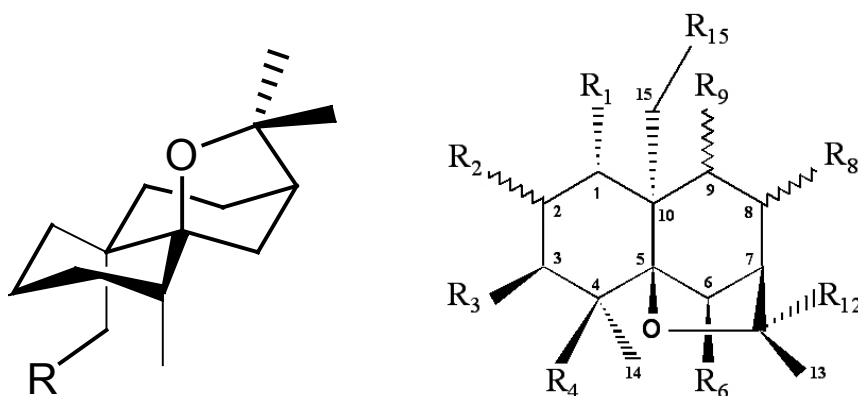


Figura 40: Sistema decalínico dihidro-β-agarofurano

El interés generado por los sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos de *Celastraceae* ha crecido paralelamente con la complejidad de las sustancias aisladas y, más importante aún, con la variedad de actividades biológicas que se les atribuye, lo que sugiere que **los derivados de este motivo sesquiterpénico pueden ser capaces de interactuar con toda una variedad de dianas celulares**. Recientemente se les han encontrado **actividades inmunosupresoras** (Duan H et al., 2001), **anti-VIH** (Duan H et al., 2000), **revertidoras del fenotipo MDR tanto en protozoos parásitos** (Kennedy ML et al., 2001) **como en células tumorales** (Muñoz-Martínez F et al., 2004), **y actividades antitumorales** (González AG et al., 2000). Además, el hecho de que muchos de tales sesquiterpenos sean activos en

ensayos basados en el uso de células intactas sugiere que **estos compuestos son suficientemente lipofílicos como para atravesar las membranas celulares**, lo que es una propiedad importante de cualquier compuesto biológicamente relevante (Cortés-Selva F et al., 2004). Basándose en sus propiedades biológicas y estructurales, los poliésteres de sesquiterpenos con esqueleto dihidro- β -agarofurano han sido propuestos como **estructuras privilegiadas**: término que describe tipos estructurales selectos, como sistemas heteroatómicos policíclicos, capaces de orientar patrones variables de sustituyentes químicos en un espacio tridimensional bien definido, y de unirse con gran afinidad a múltiples clases de receptores protéicos no relacionados (Evans BE et al., 1988).

Diseño racional de fármacos basados en la estructura de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos

Como parte fundamental del esfuerzo que viene realizando nuestro laboratorio en la investigación de nuevos agentes revertidores del fenotipo MDR, **el presente trabajo de Tesis doctoral se planteó como objetivo principal el estudio de la actividad de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de *Celastraceae* como potenciales revertidores de la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales**. Dicho estudio se centró en la **caracterización del mecanismo molecular de acción de estos compuestos como inhibidores de la Pgp humana**, con la intención de emplear este conocimiento para el **diseño racional de potentes inhibidores de esta bomba de fármacos basados en la estructura molecular de estos compuestos naturales**.

Las especies de celastráceas cuyos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos se han estudiado para realizar la presente Tesis doctoral han sido diez: ***Maytenus cuzcoina*, *Maytenus magellanica*, *Maytenus chubutensis*, *Maytenus canariensis*, *Maytenus chiapensis*, *Maytenus apurimacensis*, *Euonymus europaeus*, *Crossopetalum tonduzi*, *Crossopetalum uragoga* y *Zinowewia costaricensis***.

Para el diseño racional de un potencial fármaco de cualquier tipo, es condición necesaria conocer la base molecular de su mecanismo de acción farmacológica, esto es, la identidad de la diana celular con la que interacciona y la forma en que lo hace. Una vez identificada ésta, puede conocerse o no su estructura tridimensional, lo que va a condicionar la estrategia a seguir. En el caso de no conocerse la estructura tridimensional de la diana biológica, pero sí la de sus comprobados ligandos, el diseño racional de fármacos implicaría una estrategia indirecta, basada en el análisis comparativo de los rasgos estructurales de los ligandos conocidos activos e inactivos: esto es, el **desarrollo de un modelo QSAR**, como ya expusimos antes.

Como se verá, éste va a ser el caso de los sesquiterpenos de *Celastraceae* estudiados en el presente trabajo de Tesis doctoral, lo que en su momento condicionó la estrategia de trabajo a seguir y, en consecuencia, los objetivos deseables que poder cumplir en nuestra investigación, y que se enumerarán en el correspondiente apartado.

Objetivos

OBJETIVOS

El presente **trabajo de tesis doctoral** se ha fijado como **objetivo general** el **estudio de la actividad de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de *Celastraceae* como potenciales revertidores de la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales y la caracterización del mecanismo molecular de acción de estos compuestos como inhibidores de la Pgp humana**, con la intención de emplear este conocimiento para el **diseño racional de potentes inhibidores de esta bomba de fármacos basados en la estructura molecular de estos compuestos naturales**.

Conocer las bases moleculares de esta capacidad selectiva de inhibición de la Pgp permitiría el desarrollo de modelos computerizados de predicción de actividades (modelos **QSAR**: quantitative structure-activity relationships). Tales modelos, sobre la base de los datos de actividad farmacológica acumulados para todos los sesquiterpenos estudiados, podrían predecir la actividad de un sesquiterpeno dado sólo a partir de su estructura molecular. Esto sería una herramienta inestimable para el diseño racional de nuevos inhibidores más potentes de Pgp, basados en la estructura de dihidro- β -agarofuranos.

En resumen, los **objetivos específicos** que se persiguen en el presente trabajo de tesis son los siguientes:

1. Estudiar la capacidad de los sesquiterpenos naturales de plantas de la familia *Celastraceae* para **revertir *in vitro* el fenotipo de resistencia celular a múltiples fármacos (MDR)**, debido a la expresión de la P-glicoproteína MDR1 humana.

2. Demostrar que dicha **reversión del fenotipo MDR resulta de la inhibición específica de la actividad de transporte de fármacos de la P-**

glicoproteína, identificando así a la proteína como la potencial diana farmacológica de los sesquiterpenos.

3. Confirmar que dicha inhibición es, a su vez, la **consecuencia de una interacción directa entre la proteína y los sesquiterpenos.**

4. Localizar el **potencial sitio(s) de unión de los sesquiterpenos a la proteína**, y estudiar la relación de éste/éstos con los otros sitios de unión de fármacos previamente identificados y caracterizados.

5. Determinar cómo la unión de sesquiterpenos a Pgp afecta a las **actividades ATPasa y de transporte de fármacos** de la proteína.

6. Estudiar el **grado de especificidad de acción de los sesquiterpenos** como inhibidores del transporte de fármacos de bombas ABC: esto es, si además de a Pgp, inhiben a alguna otra proteína transportadora con funciones homólogas en el ser humano.

7. Estudiar si los sesquiterpenos, además de ser inhibidores de Pgp, son **transportados** por la propia bomba de fármacos cuya actividad inhiben.

Resultados

RESULTADOS Y PUBLICACIONES

Artículo 1. *Celastraceae Sesquiterpenes as a New Class of Modulators That Bind Specifically to Human P-Glycoprotein and Reverse Cellular Multidrug Resistance.*

Francisco Muñoz-Martínez, Peihua Lu, Fernando Cortés-Selva, José María Pérez-Victoria, Ignacio A. Jiménez, Ángel G. Ravelo, Frances J. Sharom, Francisco Gamarro, y Santiago Castanys

Publicado en: *Cancer Research*, vol. 64, p. 7130-38; 2004.

Varios trabajos previos han demostrado que algunos **sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos** aislados de plantas de la familia *Celastraceae* son capaces de revertir el **fenotipo MDR**, tanto de líneas celulares de cáncer como del protozoo parásito *Leishmania*. Sin embargo, ninguno de tales trabajos profundizó en el estudio del mecanismo molecular de acción de estos compuestos naturales.

En este trabajo, hemos estudiado la capacidad de 28 de tales compuestos para revertir el fenotipo MDR debido a la sobre-expresión de la Pgp humana, y también hemos esclarecido su mecanismo molecular de acción: **los sesquiterpenos estudiados revierten el fenotipo MDR porque funcionan como inhibidores de la actividad de transporte de fármacos de la Pgp**, tanto en células intactas como en la proteína purificada en su estado funcional y reconstituida en proteoliposomas, con una potencia inhibidora que, para algunos compuestos, resultó ser mucho mayor que la de la mayoría de inhibidores clásicos de la proteína ($K_i = 0,24 \pm 0,01 \mu\text{M}$). **Esta actividad inhibidora del transporte de fármacos de Pgp es muy específica**, pues los sesquiterpenos no afectaban, en cambio, la actividad de otros homólogos de Pgp, como las bombas de fármacos MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) y BCRP (ABCG2).

Los sesquiterpenos, para ejercer su acción farmacológica, **se unen a Pgp en sus dominios transmembrana (TMDs)**, produciendo como consecuencia de dicha unión sutiles cambios conformacionales en la proteína. Funcionan como **inhibidores no competitivos de sus dos actividades, ATPasa y de transporte de fármacos**. Dicha unión de los sesquiterpenos a Pgp **dificulta la unión de fármacos a los TMDs, pero no afecta la unión del ATP a los dominios de unión a nucleótido (NBDs)**. Por lo tanto, la inhibición observada de la actividad ATPasa de Pgp debe resultar de un **efecto alostérico** que los sesquiterpenos ejercen desde su sitio de unión en los TMDs, y que **disminuye la capacidad de la proteína para hidrolizar el ATP sin afectar a su unión**.

Celastraceae Sesquiterpenes as a New Class of Modulators That Bind Specifically to Human P-Glycoprotein and Reverse Cellular Multidrug Resistance

Francisco Muñoz-Martínez,¹ Peihua Lu,² Fernando Cortés-Selva,¹ José María Pérez-Victoria,¹ Ignacio A. Jiménez,³ Ángel G. Ravelo,³ Frances J. Sharom,² Francisco Gamarro,¹ and Santiago Castanys¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain; ²Guelph-Waterloo Centre for Graduate Work in Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada; and ³Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González," Universidad de La Laguna – Instituto Canario de Investigación del Cáncer, Tenerife, Spain

ABSTRACT

Overexpression of ABCB1 (MDR1) P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, is one mechanism by which tumor cells may develop multidrug resistance (MDR), preventing the successful chemotherapeutic treatment of cancer. Sesquiterpenes from *Celastraceae* family are natural compounds shown previously to reverse MDR in several human cancer cell lines and *Leishmania* strains. However, their molecular mechanism of reversion has not been characterized. In the present work, we have studied the ability of 28 dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes to reverse the P-glycoprotein-dependent MDR phenotype and elucidated their molecular mechanism of action. Cytotoxicity assays using human MDR1-transfected NIH-3T3 cells allowed us to select the most potent sesquiterpenes reversing the *in vitro* resistance to daunomycin and vinblastine. Flow cytometry experiments showed that the above active compounds specifically inhibited drug transport activity of P-glycoprotein in a saturable, concentration-dependent manner (K_i down to $0.24 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$) but not that of ABCC1 (multidrug resistance protein 1; MRP1), ABCC2 (MRP2), and ABCG2 (breast cancer resistance protein; BCRP) transporters. Moreover, sesquiterpenes inhibited at submicromolar concentrations the P-glycoprotein-mediated transport of [³H]colchicine and tetramethylrosamine in plasma membrane from CH^RB30 cells and P-glycoprotein-enriched proteoliposomes, supporting that P-glycoprotein is their molecular target. Photoaffinity labeling in plasma membrane and fluorescence spectroscopy experiments with purified protein suggested that sesquiterpenes interact with transmembrane domains of P-glycoprotein. Finally, sesquiterpenes modulated P-glycoprotein ATPase-activity in a biphasic, concentration-dependent manner: they stimulated at very low concentrations but inhibited ATPase activity as noncompetitive inhibitors at higher concentrations. Sesquiterpenes from *Celastraceae* are promising P-glycoprotein modulators with potential applications in cancer chemotherapy because of their MDR reversal potency and specificity for P-glycoprotein.

INTRODUCTION

The ability of cancer cells to develop resistance to multiple structurally and functionally nonrelated cytotoxic drugs, so-called multidrug resistance (MDR), is a major barrier to successful chemotherapy. Among the cellular mechanisms that contribute to MDR, overexpression of ABCB1 (MDR1) P-glycoprotein is the best studied by far (1). P-glycoprotein is a M_r 170,000 multidrug transporter that belongs to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of proteins (2). Other ABC transporters, such as ABCC1 [multidrug resistance protein 1 (MRP1); ref. 3], ABCC2 (MRP2; ref. 4), and ABCG2 [breast cancer resistance protein (BCRP); ref. 5] have also been shown to confer

MDR on cells *in vitro*. Moreover, expression of P-glycoprotein and MRP1 in many human cancers correlates with response to therapy and survival (6, 7).

These findings have prompted the interest of many researchers throughout the last two decades to develop P-glycoprotein inhibitors as a way to revert MDR in human cancers (8) or even to prevent the emergence of MDR in cancer patients (9). Many agents that modulate the function of P-glycoprotein are able to restore the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs to MDR cells *in vitro* and in experimental drug-resistant tumors *in vivo* (10). Clinical trials with MDR modulators have shown some response in tumors that were otherwise nonresponsive to chemotherapy (11, 12). However, most P-glycoprotein modulators that were shown to be effective in *in vitro* assays have proved to be weak MDR reversers in patients and toxic at high doses (13). Moreover, most of them adversely and dramatically influence the pharmacokinetics and biodistribution of coadministered chemotherapeutic drugs (8, 14). Third-generation modulators that specifically and potently inhibit P-glycoprotein have been developed to overcome the limitations of the previous ones (8, 14). Although the preliminary results of ongoing clinical trials are hopeful, their efficacy in cancer patients has not yet been shown (15). Therefore, in anticipation of a possible clinical failure of the third-generation modulators currently under study or to complement them in case of success, it is still necessary to search for new, efficient P-glycoprotein modulators without undesirable side effects.

Plant extracts of the *Celastraceae* family have been used for centuries in traditional medicine. Among the active compounds identified in those extracts are sesquiterpenes, which constitute a wide family of natural compounds with a considerable range of bioactive properties and with potential clinical applications as anticancer drugs, and MDR reversal agents in cancer cells (16) and in the protozoan parasite *Leishmania* (17, 18). Because of these previous findings, we have initiated research to determine the cellular target(s) for sesquiterpenes and to characterize their molecular mechanism of action to rationally design new, more efficient modulators based on their chemical structure.

The present work focuses on the study of 28 dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from different *Celastraceae* plants as specific inhibitors of human P-glycoprotein. A previous screening of sesquiterpenes with *in vitro* tests with MDR1-overexpressing intact cells allowed us to identify the most potent sesquiterpenes reversing P-glycoprotein-dependent MDR and to assess the interaction of sesquiterpenes with P-glycoprotein. Similar experiments using MRP1-, MRP2-, and BCRP-expressing cells showed that sesquiterpenes active against P-glycoprotein do not substantially modify the activities of these ABC transporters. The direct molecular interactions of the active sesquiterpenes were assessed in experiments with plasma membrane from CH^RB30 cells and purified protein. Binding of sesquiterpenes to P-glycoprotein was studied by competition of [³H]azidopine photoaffinity labeling of the protein and by a fluorescence quenching technique. Moreover, the modulating effect of these natural compounds on P-glycoprotein ATPase activity has also been characterized.

Received 3/26/04; revised 7/9/04; accepted 7/19/04.

Grant support: Spanish Grants SAF-2003-04200-CO2-01 (to F. Gamarro), BQU2003-09558-CO2-01 (to I. Jiménez), and SAF-2003-04200-CO2-02 (to A. Ravelo). F. Muñoz-Martínez is the recipient of a research Fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (Formación de Profesorado Universitario AP2000-0264).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Santiago Castanys, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento, s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain. Phone: 34-958-181666; Fax: 34-958-181633; E-mail: castanys@ipb.csic.es.

©2004 American Association for Cancer Research.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. ATP, vinblastine, verapamil, cyclosporin A, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), sodium orthovanadate, and colchicine were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). GF120918 was from GlaxoSmithKline (Madrid, Spain). The 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The [³H]azidopine (52 Ci/mmol) and NAMP100 amplifying solution for fluorography were from Amersham Biosciences (Barcelona, Spain). The [³H]colchicine (15 to 25 Ci/mmol) was purchased from DuPont NEN (Boston, MA). The C219 monoclonal antibody, directed against P-glycoprotein, was from Calbiochem (Madrid, Spain). Daunomycin was from Pfizer (Madrid, Spain); calcein-acetoxymethyl ester (AM) was from Molecular Probes Europe BV (Leiden, The Netherlands). The 2-(4'-maleimidylanilino)-naphthalene-6-sulfonic acid (MIANS), 2'(3')-O-2,4,6-trinitrophenyl-adenosine-5'-triphosphate (TNP-ATP), Hoechst 33342, and tetramethylrosamine were from Molecular Probes (Eugene, OR). The 1-palmitoyl-2-myristoyl-phosphatidylcholine (PMPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Asolectin was obtained from Fluka (Ronkonkoma, NY).

Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae plants *Maytenus cuzcoina*, *Maytenus canariensis*, *Maytenus magellanica*, and *Maytenus chubutensis* were isolated, purified, and characterized as described previously (18–21). The structures of all of these compounds are depicted in Fig. 1.

Cell Cultures. Mammalian cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ with their respective media and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. The cell lines were as follows: NIH-3T3 drug-sensitive parental and transfected with human *mdr1*-G185 (22); the parental, drug-sensitive AuxB1 and the colchicine-selected line CH^RB30 (23); the drug-sensitive parental MDCKII and the transfected with the human *mrp2* (24); the 2008 and the transfected with the human *mrp1* (25); and the parental MDA-MB-231 and the transfected with the human *bcrp* (26).

Modulation of Sensitivity to Daunomycin and Vinblastine. The dose-response curves of NIH-3T3 and NIH-3T3 MDR1-G185 cells to daunomycin and vinblastine were determined by MTT colorimetric assay (27) in 96-well plates. After 72 hours incubation in the presence of different concentrations of drugs and sesquiterpenes, 100 μ L of a 0.45 mg/ml MTT solution in complete DMEM + 10% heat-inactivated fetal bovine serum was added to each well. Dose-response curves were generated by nonlinear regression of the data points to a four parameters logistic curve using SigmaPlot 2000 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL): $y = \min + \{(\max - \min) / [1 + 10^{\log IC_{50} - x}]^n\}$; (Equation A), where y is the cell growth for each drug concentration x , \max is the maximal cell growth, \min is the minimal cell growth, IC_{50} is defined as the drug concentration that inhibited cell growth by 50%, and n is the Hill coefficient.

Inhibition of P-Glycoprotein-mediated Transport of Daunomycin in Intact Cells. A direct functional assay for P-glycoprotein in NIH-3T3 MDR1-G185 cells was done by flow cytometry. Twenty-four hours before the experiment, cells in logarithmic phase of growth were seeded in 24-well plates at a density of 10⁵ cells per well. For assessment of the inhibition of P-glycoprotein-mediated daunomycin efflux, cells were first incubated for 30 minutes at 37°C in DMEM + 10% heat-inactivated fetal bovine serum in the presence or absence of sesquiterpenes with 2 μ M of daunomycin. After that, cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated for an additional 30 minutes in DMEM + 10% heat-inactivated fetal bovine serum in the presence or absence of sesquiterpene but without the fluorescent probe. After this second incubation period, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in 0.2 ml of ice-cold PBS for immediate analysis. Fluorescence measurements of individual cells were done with a Becton Dickinson FacScan (BD European HQ, Erembodegem-Aalst, Belgium).

For determination of the K_i for inhibition of P-glycoprotein-mediated daunomycin efflux, defined as the concentration of modulator that inhibited daunomycin efflux by 50%, the geometric mean of the fluorescence intensity of 10⁴ cells incubated at different sesquiterpene concentrations was used for comparison. Vanadate was selected as a positive control that maximally inhibited the P-glycoprotein efflux of daunomycin. All of these values were converted to percentage inhibition of P-glycoprotein normalized for vanadate inactivation, plotted, and fitted to the Hill equation for allosteric interactions, using SigmaPlot 2000 software: $i = (I_{\max} \times S^n) / (K_i + S^n)$; (Equation B), where

i is the inhibition of daunomycin efflux at a given sesquiterpene concentration, I_{\max} is the maximal inhibition (caused by 5 mmol/L vanadate), S is the concentration of sesquiterpene, and n is the Hill coefficient.

Effect of Sesquiterpenes on Drug Transport Mediated by MRP1, MRP2, and BCRP in Intact Cells. To test whether selected sesquiterpenes have an inhibitory effect on the transport activity of MRP1, MRP2, and BCRP, functional assays similar to that described for P-glycoprotein were done, with intact cells expressing the appropriate ABC transporters, and testing by flow cytometry their ability to extrude drugs in the presence of sesquiterpenes. In the case of MRP1- and MRP2-expressing cells, calcein-AM (0.25 μ M/L) was used as a probe and cyclosporin A as positive control inhibitor. In the case of BCRP-expressing cells, the probe and the control inhibitor used were rhodamine 123 (1.5 μ M/L) and GF120918, respectively.

ATPase Activity Measurements. The ATPase activity in the presence of sesquiterpenes of P-glycoprotein in CH^RB30 cell plasma membrane vesicles and purified P-glycoprotein in CHAPS solution was determined by measuring the release of P_i from ATP as reported previously (28). Samples incubated with 500 μ M/L vanadate (which inhibited 100% of P-glycoprotein ATPase activity) were obtained in parallel and subtracted from the measurements to account for the contribution to activity of any other ATPases or phosphatases. Results of experiments carried out with plasma membrane at increasing concentrations of sesquiterpenes were fitted to a bell-shaped curve, which is characteristic of compounds that stimulate P-glycoprotein ATPase activity at low concentration but inhibit it at higher concentrations. The equation that defines such a curve is $V_{(s)} = [(K_1 K_2 V_0) + (K_2 V_1 S) + (V_2 S^2)] / [(K_1 K_2) + (K_2 S) + S^2]$; (Equation C), where $V_{(s)}$ is the ATPase activity as a function of the sesquiterpene concentration S , V_0 is the activity in the absence of sesquiterpene, V_1 is the maximal enzyme activity (if only activation occurred), and K_1 is the sesquiterpene concentration that gives half this maximal increment in the ATPase activity. V_2 is the activity at infinite concentration of the sesquiterpene, and K_2 is the sesquiterpene concentration that gives half-maximal reduction of ATPase activity from the value V_1 . For experiments with purified P-glycoprotein at increasing concentrations of sesquiterpenes, the resulting plots were fitted to an equation similar to Equation A, but in this case, y is the ATPase activity for each sesquiterpene concentration x , \max is the maximal ATPase activity, \min is the minimal ATPase activity at infinite concentration of sesquiterpene, K_2 (instead of IC_{50} in Equation A) is defined as the drug concentration that inhibits ATPase activity by 50%, and n is the Hill coefficient.

In the case of ATPase measurements at increasing ATP concentrations and different fixed concentrations of sesquiterpenes, the results were plotted and fitted to the Hill equation for allosteric interactions to obtain the kinetic parameters for P-glycoprotein ATPase activity in the presence or absence of sesquiterpenes: this equation resembled Equation B but substituted i and i_{\max} with $V_{(s)}$ and V_{\max} , respectively, where $V_{(s)}$ is the ATPase activity as a function of the ATP concentration, V_{\max} is the maximum ATPase activity at saturating concentrations of ATP, S is the concentration of ATP, n is the Hill coefficient, and K_i is the concentration of ATP that gives half V_{\max} . The constants K_{in} and K_{ic} (dissociation constant for free P-glycoprotein and for P-glycoprotein in complex with ATP, respectively) and the type of the inhibition of P-glycoprotein ATPase activity by sesquiterpenes were determined with the "Exploratory Enzyme Kinetics" application of SigmaPlot 2000 for Windows software, whose enzymological basis is the direct linear plot (29).

Plasma Membrane Preparation, P-Glycoprotein Purification, and Reconstitution. Plasma membrane vesicles from the colchicine-selected MDR Chinese hamster ovary cell line CH^RB30 were isolated as described previously (30). P-glycoprotein was purified to 90 to 95% by a procedure involving a differential two-step extraction of CH^RB30 plasma membrane with the zwitterionic detergent CHAPS followed by removal of contaminant glycoproteins on concanavalin-A Sepharose (31). Highly purified P-glycoprotein was reconstituted into proteoliposomes of PMPC by gel filtration chromatography on a Sephadex G-50 column (32). P-glycoprotein made up >85% of the reconstituted protein in the proteoliposomes as indicated by SDS-PAGE.

[³H]Azidopine Photoaffinity Labeling. Photoaffinity labeling of P-glycoprotein in CH^RB30 plasma membrane vesicles with [³H]azidopine (100 nM; 52 Ci/mmol) was carried out as described previously (33) in the presence of a 100-fold molar excess of sesquiterpenes (10 μ M/L). Membrane proteins were analyzed by SDS-PAGE on a 9% gel followed by fluorography.

Colchicine Transport in Vesicle Systems and Real-time Fluorescence Measurement of Drug Transport in Proteoliposomes. Steady-state uptake of [³H]colchicine into CH^B30 plasma membrane vesicles was determined by rapid filtration using protocols outlined previously (34). Fluorescence measurements of tetramethylrosamine transport in proteoliposomes were carried out as described previously (32). Data from the measurements of drug transport activities at increasing concentrations of sesquiterpenes were plotted and fitted to an equation similar to Equation A but with a different meaning for each parameter: *y* is the transport activity at each sesquiterpene concentration *x*; *max* is the maximal transport activity in the absence of sesquiterpene; *min* the minimal transport activity at infinite concentration of sesquiterpene; and *IC*₅₀ is replaced here for *K*_i, defined as the sesquiterpene concentration that inhibited P-glycoprotein-dependent transport of colchicine or tetramethylrosamine by 50%.

Binding of Sesquiterpenes to P-Glycoprotein and Their Effects on Hoechst 33342 and TNP-ATP Binding to the Protein. The binding affinity of sesquiterpenes to purified P-glycoprotein without labeling, or P-glycoprotein labeled with MANS at the nucleotide-binding domains, was determined with a fluorescence quenching technique as described previously for drugs, chemosensitizers and peptides (35, 36). In both cases, steady-state fluorescence measurements were carried out on solutions of 50 to 100 μg/ml P-glycoprotein in 2 mmol/L CHAPS buffer at 22°C, in the presence of 0.5 mg/ml asolectin (soybean phospholipids) added as extruded large unilamellar vesicles. Quenching of Trp or MANS-labeled P-glycoprotein fluorescence at various sesquiterpene concentrations was fitted to an equation describing binding to a single site.

The effect of sesquiterpenes on the binding of Hoechst 33342 and TNP-ATP to P-glycoprotein were monitored after two different approaches: in the first approach, we analyzed the quenching of the intrinsic Trp fluorescence of the protein, which was carried out as described above for sesquiterpene binding to P-glycoprotein. In the second approach, we studied the enhancement of the intrinsic fluorescence of TNP-ATP and Hoechst 33342 on interaction with P-glycoprotein at their binding sites (the nucleotide-binding domains and the transmembrane domains, respectively) as described previously (37, 38). Quenching titrations of purified P-glycoprotein in 2 mmol/L CHAPS buffer

were done with both dyes at different fixed concentrations of sesquiterpenes. The titrations were carried out in the presence of 100 nm extruded vesicles of asolectin (soybean phospholipids), when measuring Trp quenching. Phospholipid vesicles were omitted when measuring fluorescence enhancement to avoid interference from partitioning of the dye into the lipid bilayer. Fluorescence spectra were recorded on a PTI Alphascan-2 spectrofluorometer (Photon Technology International, London, Ontario, Canada) with the cell holder thermostated at 22°C and corrected for dilution, scattering, and the inner filter effect.

RESULTS

Reversal of P-Glycoprotein-mediated Resistance to Daunomycin and Vinblastine in NIH-3T3 MDR1-G185 Cells by Sesquiterpenes. The *in vitro* multidrug resistance reversing activity of sesquiterpenes was studied by determining the cytotoxicity of daunomycin and vinblastine (two classical P-glycoprotein substrates) in NIH-3T3 cells expressing P-glycoprotein. The ratio between *IC*₅₀ in the absence and in presence of a P-glycoprotein modulator gives the resistance reversal index, a parameter that allows quantitative comparisons between the efficiencies of different P-glycoprotein modulators. Table 1 summarizes the reversal indexes for daunomycin and vinblastine with dihydro-β-agarofuran sesquiterpenes tested at increasing concentrations of each cytotoxic drug and three fixed concentrations (10, 3, and 1 μmol/L) of sesquiterpenes. Seven sesquiterpenes (Cuzco5, Cuzco7, Mama6, Mama12, Mama14, Machu1, and C-3) reversed resistance to daunomycin with efficiencies comparable with that of verapamil (a classical P-glycoprotein modulator), and two of them (Mama5 and Machu4) had higher potencies (Fig. 1). Testing a representative subset of sesquiterpenes with vinblastine, we found essentially the same profile of relative drug resistance reversal efficiencies as described above. Interestingly, almost all of the sesquiterpenes tested showed

Table 1 Drug resistance reversal ability of sesquiterpenes in *mdr1*-transfected NIH-3T3 cells

Sesquiterpene	Reversal index with daunomycin*			Reversal index with vinblastine†		
	10 μM	3 μM	1 μM	10 μM	3 μM	1 μM
Verapamil‡	16.11 ± 2.50	13.45 ± 1.41	7.04 ± 3.10	18.76 ± 5.00	13.18 ± 0.24	6.21 ± 1.10
Cuzco1	2.82 ± 0.70	2.43 ± 0.55	2.21 ± 0.60			
Cuzco2	10.03 ± 0.60	7.80 ± 0.70	7.10 ± 0.22	20.00 ± 2.00	5.10 ± 1.50	2.10 ± 0.50
Cuzco2 hydrolyzed	1.30 ± 0.60	0.86 ± 0.25	0.80 ± 0.31			
Cuzco2 acetylated	2.90 ± 1.20	1.60 ± 0.62	0.90 ± 0.12			
Cuzco3	11.29 ± 3.00	7.57 ± 2.10	4.23 ± 1.10	15.83 ± 3.50	14.86 ± 2.60	8.98 ± 1.80
Cuzco4	2.90 ± 0.80	2.10 ± 0.40	1.50 ± 0.40			
Cuzco5	21.50 ± 3.26	16.31 ± 4.08	12.52 ± 4.50	29.30 ± 8.00	25.00 ± 3.00	10.90 ± 3.22
Cuzco5 hydrolyzed	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.13	0.80 ± 0.30			
Cuzco5 acetylated	1.60 ± 0.20	1.00 ± 0.40	0.80 ± 0.21			
Cuzco6	4.00 ± 1.20	3.40 ± 1.00	2.80 ± 0.70			
Cuzco7	18.91 ± 0.30	11.76 ± 0.50	7.51 ± 0.24	31.30 ± 5.20	20.86 ± 2.60	14.30 ± 3.40
Cuzco8	4.70 ± 1.30	2.20 ± 0.60	2.00 ± 0.50			
Cuzco9	8.76 ± 1.60	3.66 ± 0.80	1.83 ± 0.70	20.89 ± 5.39	5.40 ± 3.30	2.73 ± 1.90
Mama1	5.00 ± 1.10	3.30 ± 1.10	1.80 ± 0.50			
Mama2	10.50 ± 1.30	4.60 ± 1.00	2.30 ± 0.40			
Mama3	10.70 ± 3.00	4.90 ± 1.00	2.90 ± 0.60			
Mama4	6.00 ± 1.20	5.50 ± 1.10	3.20 ± 1.10	20.00 ± 5.00	16.70 ± 3.00	9.20 ± 3.10
Mama5	26.67 ± 3.00	24.80 ± 4.00	8.70 ± 3.70	125.00 ± 17.00	117.00 ± 22.40	41.70 ± 7.00
Mama6	20.80 ± 5.00	13.90 ± 0.80	2.20 ± 0.40			
Mama7	7.10 ± 4.80	2.70 ± 0.90	1.60 ± 1.00			
Mama10	2.20 ± 0.80	1.40 ± 0.40	1.10 ± 0.40	57.10 ± 9.00	7.40 ± 3.00	2.50 ± 2.00
Mama11	4.10 ± 1.80	2.00 ± 0.10	1.50 ± 0.20	22.20 ± 4.00	5.40 ± 2.00	3.40 ± 2.70
Mama12	21.76 ± 0.90	12.75 ± 0.90	6.13 ± 2.10	87.10 ± 14.00	60.60 ± 11.00	55.60 ± 7.00
Mama13	3.30 ± 1.10	1.60 ± 0.60	1.40 ± 0.40			
Mama14	19.10 ± 4.00	10.30 ± 2.90	5.60 ± 0.80			
Machu1	18.80 ± 4.20	16.00 ± 5.00	11.40 ± 6.30			
Machu4	33.51 ± 3.20	31.11 ± 2.95	11.10 ± 4.80	103.21 ± 13.00	94.48 ± 8.00	33.67 ± 7.90
C-3	16.40 ± 5.20	10.80 ± 1.10	8.20 ± 1.70	63.50 ± 6.00	22.40 ± 4.50	10.32 ± 4.65

NOTE: Screening of sesquiterpenes reversing P-glycoprotein-dependent resistance to daunomycin and vinblastine in NIH-3T3 cells transfected with human MDR1 protein. The reversal index was defined as the ratio between the *IC*₅₀ of cells without sesquiterpene and the *IC*₅₀ with sesquiterpene. *IC*₅₀ values were determined using equation 1 as described in Materials and Methods. Results are of two to four independent experiments performed in triplicate; mean ± SD (*P* < 0.05).

* The maximum reversal index with daunomycin (ratio between *IC*₅₀ for wild-type and MDR cells) is 27.5.

† The maximum reversal index with vinblastine (ratio between *IC*₅₀ for wild-type and MDR cells) is 128.3.

‡ Verapamil is a classical P-glycoprotein modulator used for comparison.

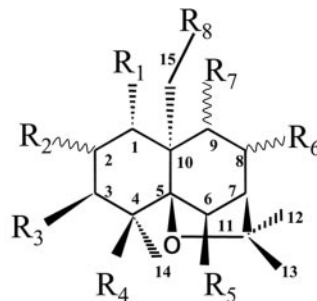


Fig. 1. Structure of the sesquiterpenes studied in the present work. (OAc, acetate; OBz, benzoate; ONic, nicotine; OPr, propionate; OMeBut, methylbutyrate; OCin, cinamate; OFu, furoate; OH, hydroxyl group; H, hydrogen)

Source and Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
Maytenus cuzcoina								
Cuzco1	OAc	αOBz	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco2	OAc	αOFu	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco2 hydrolyzed in 6	OAc	αOFu	H	OH	OH	H	βOFu	H
Cuzco2 acetylated in 6	OAc	αOFu	H	OH	OAc	H	βOFu	H
Cuzco3	OAc	H	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco4	OAc	αOMeBut	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco5	OAc	αOAc	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco5 hydrolyzed in 6	OAc	αOAc	H	OH	OH	H	βOFu	H
Cuzco5 acetylated in 6	OAc	αOAc	H	OH	OAc	H	βOFu	H
Cuzco6	OAc	αOPr	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco7	OAc	αOAc	H	OH	OFu	H	βOFu	OAc
Cuzco8	OAc	αOAc	H	OH	OBz	H	βOBz	OAc
Cuzco9	OAc	αOH	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Maytenus magellanica								
Mama1	OBz	βOAc	ONic	OH	OAc	H	βOCin	H
Mama2	OBz	βOAc	ONic	OH	OAc	H	βOBz	H
Mama3	ONic	βOAc	OAc	OH	H	βOBz	βOBz	H
Mama4	ONic	βOAc	OBz	OH	H	βOAc	βOBz	H
Mama5	OBz	βOAc	OAc	OH	H	βOBz	βOBz	H
Mama6	OBz	βOAc	OAc	OH	H	βOAc	βOBz	H
Mama7	OCin	βOAc	ONic	OH	H	H	βOBz	H
Mama10	OBz	βOAc	H	OH	H	H	βOCin	H
Mama11	OBz	βOAc	H	OH	H	H	βOBz	H
Mama12	OAc	αONic	H	OH	OBz	H	βOBz	OAc
Mama13	OBz	αONic	H	H	OAc	βOAc	βOBz	H
Mama14	OBz	αOBz	H	OH	OAc	βOAc	βOBz	H
Maytenus chubutensis								
Machu1	OBz	βOAc	OH	H	OAc	H	βOBz	H
Machu4	OAc	αONic	H	H	OBz	H	βOBz	OAc
Maytenus canariensis								
C-3	OAc	H	H	OH	OAc	αOMeBut	αOBz	OAc

substantially higher reversal indexes with vinblastine than with daunomycin, and the most potent of them (Machu4, Mama5, and Mama12) reverted vinblastine resistance at 1 μmol/L with potencies that were from 5- to 9-fold greater than that of verapamil. This means that at this low concentration, the above-mentioned sesquiterpenes were able to decrease the resistance to vinblastine of the MDR1-overexpressing cells from 128.3 to 2 to 4 times the intrinsic resistance of wild-type cells and from 27.5 to 2 to 3 times in the case of daunomycin.

The intrinsic toxicity of the most potent sesquiterpenes, used at concentrations up to 10 μmol/L in wild-type drug-sensitive NIH-3T3 cells, was generally lower than that of verapamil (43.70 ± 2.80, 14.20 ± 2.20, 26.40 ± 1.30, 18.70 ± 1.50, and 17.95 ± 0.05% of growth inhibition at 10 μmol/L for verapamil, Cuzco5, Mama5, Mama12, and Machu4, respectively; *P* < 0.05).

Inhibition of P-Glycoprotein-mediated Daunomycin Efflux by Sesquiterpenes in Intact Cells. When determining the inhibition of daunomycin efflux at increasing concentration of sesquiterpenes, we

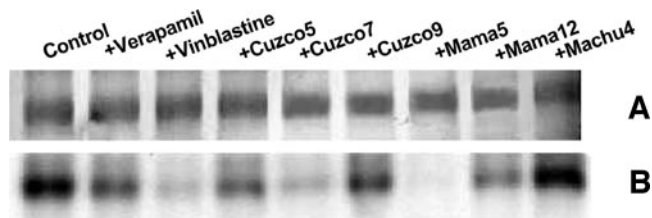


Fig. 2. Modulation by sesquiterpenes of photoaffinity labeling with ^3H azidopine of P-glycoprotein in plasma membrane from $\text{CH}^{\text{R}}\text{B30}$ cells. Photolabeling was done in the presence of $10\ \mu\text{mol/L}$ sesquiterpenes (100-fold molar excess with respect to the probe) or the same concentration of verapamil and vinblastine for comparison. In a typical experiment, around $50\ \mu\text{g}$ of protein per sample was used, and Western blots with C-219 monoclonal antibody were also carried out to normalize the amount of P-glycoprotein loaded. The figure is a representative experiment of three different assays. Western blot (A) was developed with antimouse secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase, and fluorography with ^3H azidopine (B) was developed after 4 days at -80°C . For additional details see Materials and Methods.

obtained saturable, concentration-dependent curves that were monophasic with no signs of substantially cooperativity, except for sesquiterpene C-3 (data not shown). From these curves, we obtained the K_i values for inhibition of daunomycin efflux. The most potent sesquiterpenes inhibiting daunomycin efflux had K_i values in the submicromolar range (as low as $0.24 \pm 0.01\ \mu\text{mol/L}$ and $0.33 \pm 0.01\ \mu\text{mol/L}$ for Machu4 and Mama12, respectively; $P < 0.001$).

Ability of Sesquiterpenes to Inhibit the BCRP, MRP1, and MRP2 Transporters in Mammalian Cells. Five sesquiterpenes shown previously to reverse P-glycoprotein-mediated MDR *in vitro* (Cuzco5, Cuzco7, Mama5, Mama12, and Machu4) were assayed. In calcein accumulation experiments, $10\ \mu\text{mol/L}$ cyclosporin A was able to restore the intracellular calcein accumulation levels in MRP1- and MRP2-expressing cells to 95% and 81%, respectively, of that reached in the wild-type cells. Sesquiterpenes at the same concentration were able to increase intracellular calcein accumulation to levels no higher than 30% and 45%, respectively. In rhodamine 123 efflux experiments, GF120918 at $1\ \mu\text{mol/L}$ caused intracellular accumulation of rhodamine 123 in BCRP-expressing MDA-MB-231 cells to levels up to 83% of those observed in drug-sensitive cells. However, sesquiterpenes at $10\ \mu\text{mol/L}$ increased rhodamine 123 intracellular accumulation to levels no higher than 26% of the levels in wild-type cells. In contrast, sesquiterpene Machu4 at $2\ \mu\text{mol/L}$ was able to block 97% of P-glycoprotein-mediated daunomycin efflux from MDR1-expressing cells.

Photoaffinity Labeling of P-Glycoprotein with ^3H Azidopine in the Presence of Sesquiterpenes. Plasma membrane vesicles from $\text{CH}^{\text{R}}\text{B30}$ cells (which express P-glycoprotein up to 15% of the total

membrane protein) were coincubated with the radioligand and a 100-fold molar excess of different sesquiterpenes ($10\ \mu\text{mol/L}$: a concentration in which they clearly display their MDR reversal effect). For comparison, parallel samples were also coincubated with the same concentration of the classical P-glycoprotein substrates verapamil and vinblastine, which are known to compete with photolabeling by direct binding and displacement of ^3H azidopine from the drug-binding sites of P-glycoprotein. Fig. 2 shows that verapamil and vinblastine compete for azidopine photolabeling of the protein with efficiencies in accordance with their respective binding affinities to P-glycoprotein, reported elsewhere (35, 39). All but one of the tested sesquiterpenes inhibited labeling of P-glycoprotein with ^3H azidopine, with relative efficiencies that correlate roughly with their efficiencies as blockers of P-glycoprotein-mediated drug transport activity. Surprisingly, the only sesquiterpene that did not seem to compete for photolabeling is Machu4, which is the most potent sesquiterpene-reversing P-glycoprotein-mediated MDR found in the present work. In this regard, Mama12, which is almost as efficient as Machu4 at blocking P-glycoprotein drug transport activity and does compete for photoaffinity labeling of P-glycoprotein by ^3H azidopine, differs from Machu4 only by the presence of a hydroxyl group at position 4 (see Fig. 1). It is possible that although sesquiterpenes may share a common mechanism of action on P-glycoprotein, the specific binding site(s) that they are interacting with within the transporter could be different, depending on subtle changes in the molecular structure of these compounds.

Effect of Sesquiterpenes on P-Glycoprotein ATPase Activity. Multiple P-glycoprotein substrates and modulators are known to modulate P-glycoprotein ATPase activity. When we examined the effect of a set of sesquiterpenes on the ATPase activity of $\text{CH}^{\text{R}}\text{B30}$ plasma membrane, we found the typical bell-shaped activation curves reported previously for many P-glycoprotein substrates and inhibitors (Fig. 3A). These curves are suggested to arise from the presence of two binding sites for the modulator, one that activates (K_1) and one (of lower affinity, K_2) that inhibits (39). When the data points were fitted to a modified form of the classical Michaelis-Menten equation (Equation C; see Material and Methods), half-maximal stimulation (K_1) and inhibition (K_2) constants could be extracted, which are a measure of the effectiveness of the modulator as an activator or inhibitor. For the tested sesquiterpenes, the K_1 values were in the low submicromolar range (18 to 53 nM), and the K_2 values were in the submicromolar to micromolar range (250 nM to $4.6\ \mu\text{mol/L}$). The concentration range in which sesquiterpenes sensitize MDR P-glycoprotein-overexpressing cells matched with the K_2 for inhibition of P-glycoprotein ATPase

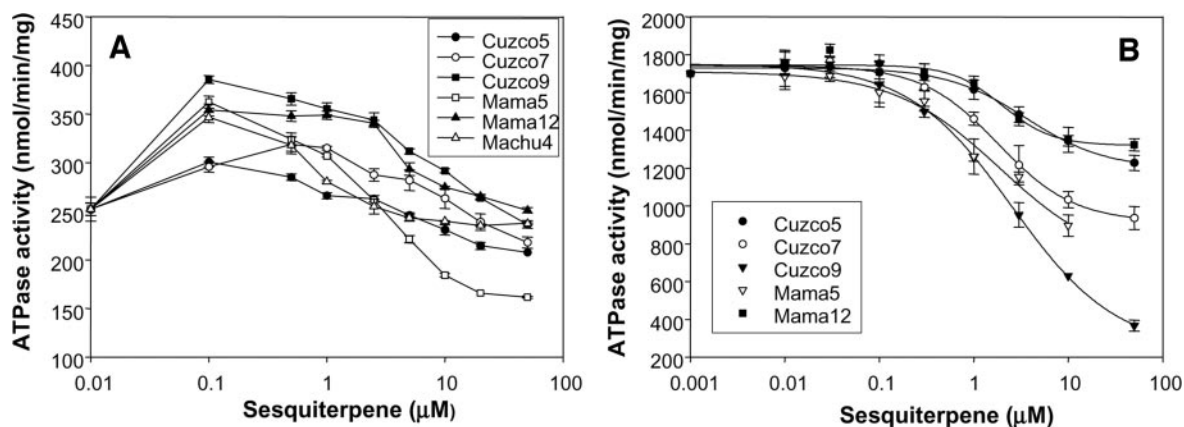


Fig. 3. Modulation of P-glycoprotein ATPase activity by sesquiterpenes. $\text{CH}^{\text{R}}\text{B30}$ plasma membrane vesicles (A) or purified P-glycoprotein in CHAPS solution (B) were assayed for Mg^{2+} -dependent ATPase activity at $1\ \text{mmol/L}$ ATP in the presence of increasing concentrations of different sesquiterpenes. The amount of proteins per sample were typically 1 to $2\ \mu\text{g}$, and the differences between the ATPase activities measured in the absence and presence of $500\ \mu\text{mol/L}$ of vanadate were plotted. Data points represent triplicate determinations in representative experiments; Bars, $\pm\text{SD}$.

activity, with no substantially toxic effects in intact cells at the same concentrations. Surprisingly, when we studied the effect of the same sesquiterpenes on the ATPase activity of purified P-glycoprotein in CHAPS solution, we found that sesquiterpenes had lost their ability to stimulate P-glycoprotein ATPase activity and only retained their inhibitory effect (Fig. 3B), with K_2 values almost unchanged with respect to those measured in plasma membrane. For comparison, verapamil was still able to stimulate ATPase activity of purified

protein as it did in plasma membrane (data not shown), which suggests that P-glycoprotein, despite not being localized within a lipid membrane, conserved its native conformation. Therefore, it seems likely that these sesquiterpenes lost their stimulatory effect not because of modifications in P-glycoprotein conformation but because of changes in their mode of interaction to the transporter, which seems to require the presence of membrane lipids. Such interesting phenomenon deserves additional investigation.

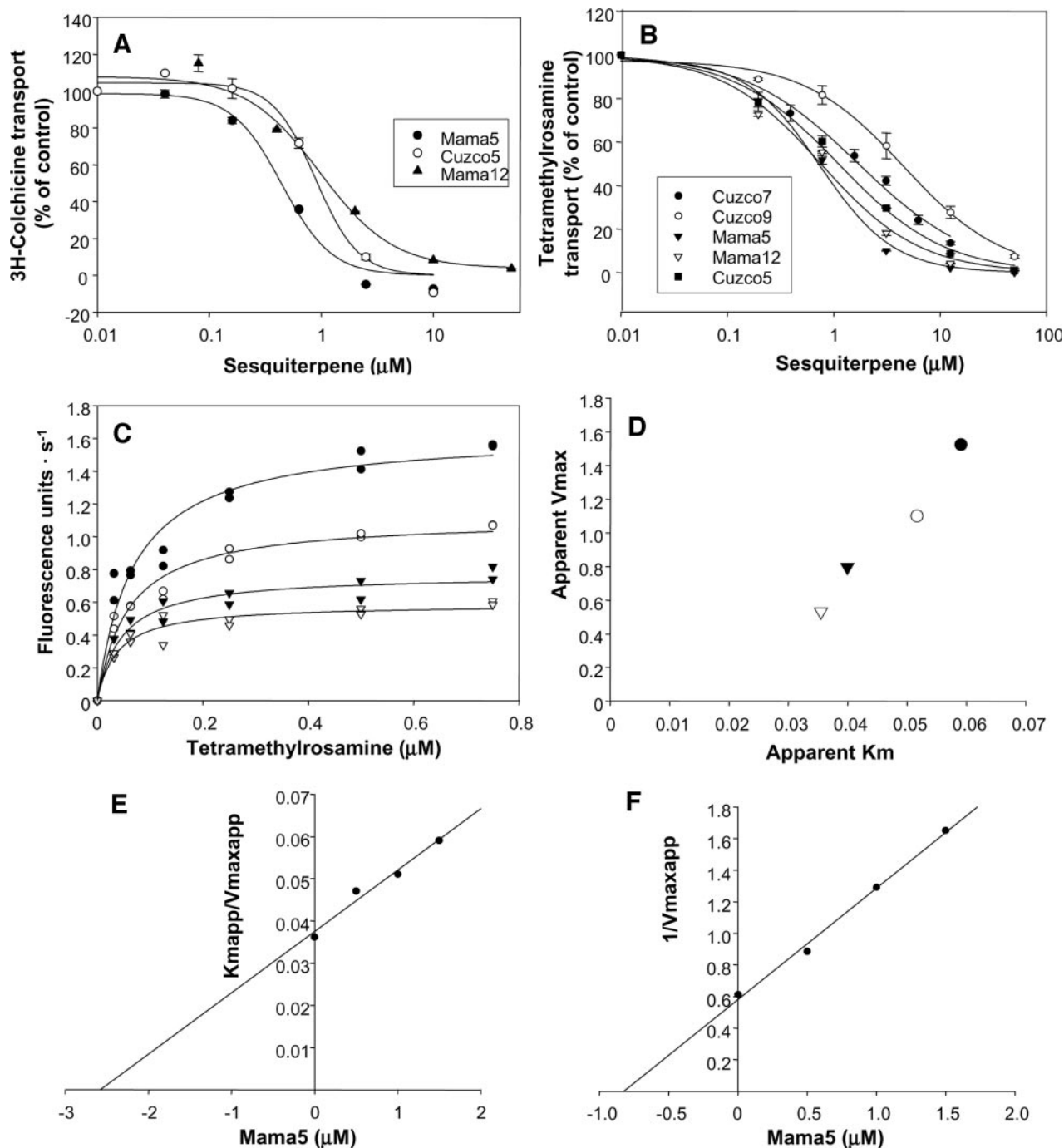


Fig. 4. Modulation of P-glycoprotein drug transport activity by sesquiterpenes, and kinetic analysis of inhibition of P-glycoprotein-dependent tetramethylrosamine transport in proteoliposomes. Equilibrium uptake of [^3H]colchicine into plasma membrane vesicles of MDR1-expressing CH 2 B30 cells (A) and tetramethylrosamine transport into reconstituted PMPC proteoliposomes containing P-glycoprotein (B) was measured at increasing concentrations of sesquiterpenes at 22°C in the presence of 1 mmol/L ATP and an ATP-regenerating system. A and B, representative experiments in which the data points are for duplicate determinations of the steady-state uptake of colchicine and for triplicate determinations of the tetramethylrosamine transport rate, respectively; bars, \pm SD. Where not visible, the error bars are contained within the symbols. For the kinetic analysis, the tetramethylrosamine transport rate at increasing concentrations of tetramethylrosamine was measured in the presence of different fixed concentrations of the sesquiterpene Mama5 (1.5 $\mu\text{mol/L}$ ∇ , 1 $\mu\text{mol/L}$ \blacktriangledown , 0.5 $\mu\text{mol/L}$ \circ , and without Mama5 \bullet). Two independent measurements, expressed as the change in fluorescence (arbitrary units)/second, were carried out. Data points were fitted to the Michaelis-Menten equation (C). The kinetic analysis of the data are also shown: D, direct linear plot; and E and F, secondary plots.

Kinetic analysis of the inhibition of ATPase activity in plasma membrane by the sesquiterpenes Mama5 and Cuzco9 revealed that they functioned as noncompetitive or mixed-type inhibitors of ATPase activity (data not shown). This means that these compounds inhibited ATPase activity by negative allosteric effects, presumably resulting from direct interactions at the transmembrane domains, rather than direct competition with ATP at the nucleotide-binding domains.

Inhibition of P-Glycoprotein-mediated Drug Transport by Sesquiterpenes in Plasma Membrane Vesicles and P-Glycoprotein-enriched Proteoliposomes. Equilibrium uptake of [3 H]colchicine into CH R B30 plasma membrane vesicles (Fig. 4A) and real-time tetramethylrosamine transport into P-glycoprotein-containing PMPC proteoliposomes (Fig. 4B) was determined in the presence of increasing concentrations of various sesquiterpenes. In both systems, sesquiterpenes showed similar behavior; colchicine transport was 90% inhibited at 1.4, 2, and 3.5 μ mol/L of Mama5, Cuzco5, and Mama12, respectively, whereas 5 μ mol/L verapamil was needed to reach the same inhibition (data not shown). In the proteoliposome system, Mama5 inhibited tetramethylrosamine transport by 90% at around 4.2 μ mol/L, which was an efficiency similar to that observed for cyclosporin A (4 μ mol/L) and 5 times higher than the potency of verapamil (20 μ mol/L) for inhibiting tetramethylrosamine transport in the same system (32). In general, all of the sesquiterpenes tested showed a slightly lower K_i for inhibition of colchicine transport relative to that for inhibition of tetramethylrosamine transport (e.g., for Mama5, the K_i is 0.45 ± 0.10 μ mol/L and 0.74 ± 0.15 μ mol/L for inhibition of colchicine and tetramethylrosamine transport, respectively). However, because these processes were measured in different systems (plasma membrane *versus* artificial proteoliposomes composed only of PMPC), it cannot be determined if the observed differences are because of the system itself or because the P-glycoprotein substrate used in each case binds to different regions within the transporter. In addition, the tetramethylrosamine experiments monitor an initial rate of transport, whereas the colchicine experiments measure equilibrium drug uptake.

Kinetic analysis of the inhibition of P-glycoprotein-mediated tetramethylrosamine transport in proteoliposomes (Figs. 4, C–F) revealed that sesquiterpene Mama5 behaved as a mixed-type inhibitor of tetramethylrosamine transport, with higher affinity for P-glycoprotein in complex with tetramethylrosamine ($K_{ic} = 0.7$ μ mol/L) than for P-glycoprotein alone ($K_{iu} = 2.6$ μ mol/L). This implies that Mama5 and tetramethylrosamine bind to different sites within the transporter and that the simultaneous binding of tetramethylrosamine and the sesquiterpene to P-glycoprotein favored a tighter interaction of Mama5 with the protein rather than precluding it.

It is worth noting that the ratio between drug (colchicine or tetramethylrosamine) transport activity and ATPase activity decreased as sesquiterpene concentration increased (data not shown).

Quenching of the Fluorescence Trp Residues and MIANS-labeled P-Glycoprotein by Sesquiterpenes. Binding of MDR spectrum drugs and modulators to native P-glycoprotein and MIANS-labeled P-glycoprotein has been reported to lead to substantial saturable quenching of intrinsic Trp fluorescence (35) and the bound MIANS probe (31). Similarly, addition of sesquiterpenes caused a saturable, concentration-dependent quenching of both native P-glycoprotein and MIANS-P-glycoprotein (data not shown). The quench curves were monophasic for the two tested sesquiterpenes (Mama5 and Mama12), which suggests that they bind to a single site within P-glycoprotein. Whatever this binding site was, the binding affinity of Mama12 obtained by quenching of Trp fluorescence was very similar to that obtained from quenching of the fluorescence of MIANS-P-glycoprotein, with a low degree of quenching (<10%) in both cases. To check that the P-glycoprotein used for these experiments was functional and correctly folded, ATPase activity measurements and

quenching curves with rhodamine 123 and TNP-ATP were done on the same preparation in parallel (data not shown). The latter two compounds were shown to give a high degree of quenching of Trp fluorescence as described previously (35, 37). The P-glycoprotein samples retained ATPase activity, which was stimulated by verapamil. In addition, rhodamine 123 and TNP-ATP generated saturable, concentration-dependent quenching curves as expected. The maximal Trp quenching values for rhodamine 123 and TNP-ATP were 96% and 85%, respectively, with K_d values of 82 μ mol/L and 76 μ mol/L, respectively. It is important to note that although the values of Trp quenching obtained for both P-glycoprotein substrates were very similar to those reported previously (35), the K_d values were 20 to 25% higher. A possible reason for this phenomenon could be the nature of the lipids used in each case (PMPC in the previous study and asolectin in the present one). The differences in lipid composition (asolectin *versus* PMPC) and different drug-lipid ratios could also explain why the calculated binding affinity for Mama12 and Mama5 in this experiment was almost 10 times higher than the K_i for inhibition of tetramethylrosamine transport in PMPC proteoliposomes.

Effect of Sesquiterpenes on the Binding of Hoechst 33342 and TNP-ATP to P-Glycoprotein. Sesquiterpenes modulate both the drug transport and the ATPase activity of P-glycoprotein. To address the possibility that these compounds may affect the binding of nucleotides and substrates to P-glycoprotein, we took advantage of the intrinsic fluorescent properties of the transport substrate, Hoechst 33342, and the nucleotide analog TNP-ATP. Both compounds alone are weakly fluorescent in aqueous solution, but their quantum yields are greatly enhanced when they are transferred to a hydrophobic environment, such as the binding pocket within a protein active site. Moreover, both compounds cause the quenching of intrinsic Trp fluorescence on binding to P-glycoprotein. Therefore, there are two ways in which to monitor the process of binding of these compounds to P-glycoprotein and to study if this process is affected in some manner by sesquiterpenes. Both approaches gave similar results, but we have shown the curves obtained after the fluorescence enhancement of the two probes (Figs. 5, A and B), because they were more reproducible from one experiment to another. Sesquiterpene Mama5 did not affect TNP-ATP binding to P-glycoprotein at concentrations up to 50 μ mol/L, which is 50-fold higher than the K_2 for inhibition of ATPase activity in CH R B30 plasma membrane vesicles. On the other hand, addition of Mama5 steadily decreased the binding of Hoechst 33342 to the transmembrane domains. We also carried out kinetic analysis of this phenomenon: Mama5 decreased the K_d for Hoechst 33342 binding to P-glycoprotein at the same time that it decreased the extent of binding, and both were reduced in the same proportion at all of the tested concentrations of Mama5. This result suggests that Mama5 behaves as an uncompetitive inhibitor of Hoechst 33342 binding, affecting the binding of Hoechst 33342 to its binding site from another site that is only accessible in the P-glycoprotein-Hoechst 33342 complex. The only K_i that could be extracted from the kinetic analysis was that for Mama5 binding to P-glycoprotein in complex with Hoechst 33342 (K_{ic}), whose value was around 55 μ mol/L. Considering that Mama5 is able to block P-glycoprotein-mediated drug transport and to sensitize MDR P-glycoprotein-expressing cells at submicromolar concentrations, the K_{ic} value for Hoechst 33342 binding inhibition seems high. A possible explanation may be that the effect of Mama5 on Hoechst 33342 binding process was monitored in P-glycoprotein solutions in 2 mmol/L CHAPS buffer without any added lipids. Many P-glycoprotein modulators are known to act by partitioning into the lipid bilayer, thus increasing their effective concentration in the lipid phase. The absence of such a lipid environment may hinder the ability of Mama5 to interact efficiently to P-glycoprotein and to affect Hoechst 33342 binding in the concentration range in which it is able to block P-glycoprotein drug transport when a lipid bilayer is present.

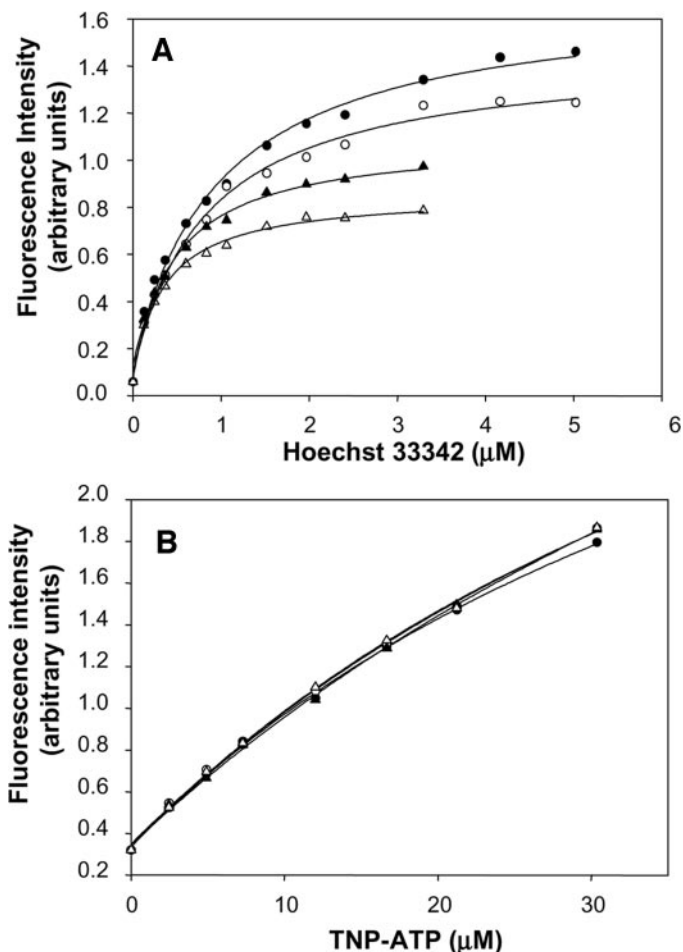


Fig. 5. Effect of the sesquiterpene Mama5 (50 $\mu\text{mol/L}$ Δ , 25 $\mu\text{mol/L}$ \blacktriangle , 12.5 $\mu\text{mol/L}$ \circ , and without Mama5 \bullet) on binding of Hoechst 33342 (A) and TNP-ATP (B) to purified P-glycoprotein. Enhancement of the intrinsic fluorescence of Hoechst 33342 on interaction with unlabeled P-glycoprotein was monitored at 460 nm after excitation at 350 nm, whereas the enhancement of TNP-ATP fluorescence was monitored at 535 nm after excitation at 408 nm. P-glycoprotein solutions (150 $\mu\text{g/mL}$ protein) were titrated with increasing concentrations of Hoechst 33342 or TNP-ATP at the fixed concentrations of Mama5 described above, and the fluorescence changes were monitored. The same batch of P-glycoprotein was used for both experiments represented in A and B.

DISCUSSION

The present study has focused on the identification of P-glycoprotein as the cellular target of sesquiterpenes and on the study of their molecular mechanism of action.

Although none of the 28 sesquiterpenes tested showed greater potency in modulating P-glycoprotein than previously described third-generation modulators, such as LY335979 (40), many of them had a potency greater than the classical first-generation modulator verapamil, and three of them had comparable potency to cyclosporin A. One of the advantages of sesquiterpenes with respect to first-generation modulators is that *Celastraceae* plants containing high doses of sesquiterpenes have been used worldwide for centuries in traditional medicine with no deleterious effects on human health. Moreover, the most effective sesquiterpenes tested against P-glycoprotein had almost no effect on MRP1, MRP2, and BCRP drug transport activities *in vitro* in the same concentration range, which shows that the tested sesquiterpenes were specific modulators of P-glycoprotein. It is also worth noting that the most efficient sesquiterpenes were less toxic than verapamil toward cultured drug-sensitive cells but were specifically more toxic toward P-glycoprotein-expressing cells (data not shown). This finding is very interesting, considering that P-glycopro-

tein is presumably involved in malignancy of cancer cells as well as drug resistance (41) and that inhibition of P-glycoprotein by PSC-833 led to a selective direct elimination of MDR cells (42).

The results concerning the modulation of photoaffinity labeling of P-glycoprotein with [^3H]azidopine as well as the P-glycoprotein ATPase activity and the P-glycoprotein-mediated transport of [^3H]colchicine support the proposal of a direct interaction between sesquiterpenes and P-glycoprotein. Modulation of tetramethylrosamine transport in P-glycoprotein-enriched proteoliposomes, the quenching of both Trp and MIANS probes on binding of sesquiterpenes to purified P-glycoprotein and MIANS-P-glycoprotein, and the inhibition of Hoechst 33342 binding to purified P-glycoprotein by sesquiterpene Mama5 are definite evidence of the direct interaction of sesquiterpenes from *Celastraceae* with P-glycoprotein. Regarding the mechanism of action of sesquiterpenes as P-glycoprotein inhibitors, the results of the present study suggest that these compounds block drug transport activity of P-glycoprotein by binding to the transmembrane domains rather than the nucleotide-binding domains. Moreover, the kinetic analysis of ATPase activity inhibition by sesquiterpenes Mama5 and Cuzco9 revealed that these compounds act as noncompetitive/mixed-type inhibitors, affecting ATPase activity by negative allosteric effects as a consequence of direct interactions at transmembrane domains and not because of direct competition with ATP at the nucleotide-binding domains. This mechanism of action gains support from the fact that Mama5 did affect binding of Hoechst 33342 to transmembrane domains but not that of TNP-ATP to nucleotide-binding domains. Finally, sesquiterpenes inhibited drug transport more efficiently than ATPase activity of P-glycoprotein. At the concentration range that sesquiterpenes sensitized MDR P-glycoprotein-overexpressing cells, they efficiently inhibited drug transport, whereas a substantially ATPase activity still remained. Therefore, sesquiterpenes do not block drug transport by inhibiting the "ATP-fueled engines" of the transporter (the nucleotide-binding domains). On the contrary, they should block drug transport itself at the transmembrane domains and, as a consequence of the coupling between the domains, ATPase activity may be consequently inhibited. Sesquiterpenes Mama5 and Cuzco9 have different efficiencies as P-glycoprotein modulators, yet inhibited P-glycoprotein ATPase activity in the same manner (as noncompetitive/mixed inhibitors). Because all of the tested sesquiterpenes share a common chemical structure with few modifications on the basic skeleton, it may be assumed that the general mechanism of action of sesquiterpenes is essentially common (by interaction with the transmembrane domains), independent of their respective reversal potencies.

Other questions that remain to be answered include whether all of the sesquiterpenes bind to the same binding site(s) within the transmembrane domains, how many binding sites they interact with (if more than one exists), and the location of such binding site(s). The modulation of [^3H]azidopine photoaffinity labeling by sesquiterpenes was markedly affected by even subtle changes in the molecular structure, which suggests that although sesquiterpenes should bind to transmembrane domains, they may not be doing so exactly at the same site. According to the model of Loo and Clarke (43), which considers P-glycoprotein-drug interactions at the level of only one poly specific binding site, it is not surprising that even closely related compounds may bind to different but overlapping sites within the transmembrane domains. In fact, the stereoisomers *cis*- and *trans*-flupentixol each bind to different sites within P-glycoprotein (44). This may also explain why the sequences in efficiencies obtained for the tested sesquiterpenes are slightly different from one kind of experiment to another, because different drug substrates were used in each experimental approach, and each of them may bind to different, overlapping drug binding sites. The bell-shaped profile of P-glycoprotein ATPase activity modulation suggests the existence of two different binding sites of high and low affinity for sesquiterpenes. However, only the low-affinity binding seems to be responsible for the

pharmacological effects associated with P-glycoprotein-sesquiterpenes interactions, given that these compounds reverse *in vitro* MDR in the same concentration range as the K_2 for ATPase activity inhibition. Moreover, no substantial cooperativity (except for sesquiterpene C-3) was observed in the curves of daunomycin efflux inhibition from intact cells obtained for 11 sesquiterpenes (data not shown), suggesting that only one functional binding site for sesquiterpenes exists in P-glycoprotein. In addition, quenching of P-glycoprotein and P-glycoprotein-MIANS by sesquiterpenes Mama5 and Mama12 was best fitted to monophasic curves describing binding to a single site. Therefore, although more than one site may be implicated in sesquiterpene binding, each one seems to bind to a single functional site within the transmembrane domains of P-glycoprotein.

In summary, all of the evidence shown in the present work supports P-glycoprotein as the molecular target for *Celastraceae* sesquiterpenes and shows that these natural compounds are efficient and specific P-glycoprotein modulators with promise for clinical application in the treatment of MDR malignancies. Additional improvement of their potency as blockers of P-glycoprotein-mediated drug transport activity would make them suitable for entry into clinical studies. Moreover, the identification of P-glycoprotein as their cellular target and improved knowledge of their molecular mechanism of action has prompted us to start the studies conducing to the development of a computer-assisted quantitative structural-activity relationship model that will allow the rational design of new molecules with higher potency and specificity based on the common molecular structure of sesquiterpenes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pilar Navarro for her excellent technical assistance with the cell cultures and Miguel Lugo-Álvarez for his valuable theoretical discussions regarding the ATPase and fluorescence quenching experiments. We also thank Dr. Ira Pastan (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD) for providing the NIH-3T3 and NIH-3T3 MDR-G185 cell lines; Dr. Piet Borst (Division of Molecular Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for providing the 2008, 2008-MRP1 clone 8, MDCKII, and MDCKII-MRP2 clone 17 cell lines; Dr. Douglas D. Ross (University of Maryland Greenebaum Cancer Center, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD) for providing the MDA-MB-231 and MDA-MB-231-BCRP cell lines; and Francisco Javier Pérez-Victoria for helpful discussion and contributions as this work progressed. Finally, we acknowledge Pfizer for providing the daunomycin used in this work.

REFERENCES

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48–58.
- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3004–8.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (Wash DC)* 1992;258:1650–4.
- Chen ZS, Kawabe T, Ono M, et al. Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol* 1999;56:1219–28.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15665–70.
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999;94:1086–99.
- van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:3205–14.
- Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003;10:159–65.
- Bekecic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G, Dumontet C, Sikic BI. Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 1995;87:1593–602.
- Sikic BI. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997;34:40–7.
- Chan HS, DeBoer G, Thiessen JJ, et al. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation. *Clin Cancer Res* 1996;2:1499–508.
- Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, et al. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* 2000;11:1471–6.
- Fisher GA, Sikic BI. Clinical studies with modulators of multidrug resistance. *Hematol Oncol Clin N Am* 1995;9:363–82.
- Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11:265–83.
- Robert J, Jarry C. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* 2003;46:4805–17.
- Spivey AC, Weston M, Woodhead S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem Soc Rev* 2002;31:43–59.
- Perez-Victoria JM, Tincusi BM, Jimenez IA, et al. New natural sesquiterpenes as modulators of daunomycin resistance in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *J Med Chem* 1999;42:4388–93.
- Kennedy ML, Cortes-Selva F, Perez-Victoria JM, et al. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* 2001;44:4668–76.
- Gonzalez AG, Tincusi BM, Bazzocchi IL, et al. Anti-tumor promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). *Bioorg Med Chem* 2000;8:1773–8.
- Gonzalez AG, Jimenez IA, Ravelo AG, Bazzocchi IL. β -Agarofuran sesquiterpenes from *Maytenus canariensis*. *Phytochemistry* 1990;29:2577–9.
- Cortes-Selva F, Campillo M, Reyes CP, et al. SAR studies of dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J Med Chem* 2004;47:576–87.
- Cardarelli CO, Aksentijevich I, Pastan I, Gottesman MM. Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. *Cancer Res* 1995;55:1086–91.
- Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature (Lond)* 1985;316:820–3.
- Evers R, Kool M, van Deemter L, et al. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 1998;101:1310–9.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6914–9.
- Erlichman C, Boerner SA, Hallgren CG, et al. The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res* 2001;61:739–48.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- Sharom FJ, DiDiodato G, Yu X, Ashbourne KJ. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter with peptides and ionophores. *J Biol Chem* 1995;270:10334–41.
- Eisenthal R, Cornish-Bowden A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J* 1974;139:715–20.
- Doige CA, Sharom FJ. Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif* 1991;2:256–65.
- Liu R, Sharom FJ. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* 1996;35:11865–73.
- Lu P, Liu R, Sharom FJ. Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state. *Eur J Biochem* 2001;268:1687–97.
- Safa AR, Glover CJ, Sewell JL, et al. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 1987;262:7884–8.
- Sharom FJ, Yu X, DiDiodato G, Chu JW. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem J* 1996;320(Pt 2):421–8.
- Liu R, Siemiarczuk A, Sharom FJ. Intrinsic fluorescence of the P-glycoprotein multidrug transporter: sensitivity of tryptophan residues to binding of drugs and nucleotides. *Biochemistry* 2000;39:14927–38.
- Sharom FJ, Yu X, Lu P, et al. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem Pharmacol* 1999;58:571–86.
- Liu R, Sharom FJ. Fluorescence studies on the nucleotide binding domains of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* 1997;36:2836–43.
- Qu Q, Sharom FJ. Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry* 2002;41:4744–52.
- Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T, Stein WD. Structure-activity relationships of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1997;1361:159–68.
- Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropylidibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* 1996;56:4171–9.
- Shtil AA. P-glycoprotein as a therapeutic target: good news. *Leukemia (Baltimore)* 2002;16:2169–70.
- Lehne G, Sorensen DR, Tjonnfjord GE, et al. The cyclosporin PSC 833 increases survival and delays engraftment of human multidrug-resistant leukemia cells in xenotransplanted NOD-SCID mice. *Leukemia (Baltimore)* 2002;16:2388–94.
- Loo TW, Clarke DM. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 2002;277:44332–8.
- Dey S, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, Ambudkar SV. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10594–9.

Artículo 2. *Reversion of Human Pgp-Dependent Multidrug Resistance by New Sesquiterpenes from *Zinowiewia costaricensis**

Francisco Muñoz-Martínez, Cristina R. Mendoza, Isabel L. Bazzocchi, Santiago Castanys, Ignacio A. Jiménez, y Francisco Gamarro

Publicado en: *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 48, p. 4266-75; 2005.

En este trabajo se describe el resultado del estudio intensivo que nuestro laboratorio, en colaboración con el de los Doctores Ignacio A. Jiménez e Isabel L. Bazzocchi, viene realizando para identificar nuevos compuestos revertidores del fenotipo MDR en células tumorales. **Se describe en él el aislamiento, caracterización estructural, y análisis de las propiedades biológicas de 19 nuevos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de la planta sudamericana *Zinowiewia costaricensis*.** De entre ellos, **seis compuestos demostraron una eficiencia hasta 16 veces mayor como inhibidores de la P-glicoproteína humana que la de moduladores clásicos como el verapamil.**

Se realizó, además, un análisis comparativo de cómo la naturaleza de los sustituyentes químicos del esqueleto agarofuránico, y el patrón de tal sustitución, determinan la potencia inhibidora de los compuestos. La conclusión más importante de tal análisis fue que las relaciones de estructura-actividad de estos compuestos naturales son muy complejas, y que **no se puede extraer conclusiones directas y fáciles en relación a cómo la naturaleza química de un sustituyente en una posición específica puede afectar a la potencia inhibidora del compuesto.** Esto es así porque la forma en que la naturaleza de un sustituyente en una posición dada determina la actividad global se ve condicionada por la naturaleza del resto de sustituyentes de todas las demás posiciones en la molécula. Como pauta general, sólo se observa que **el grado global de esterificación** del compuesto (cuanto más mejor), y la **presencia de dos motivos éster aromáticos**, son importantes determinantes de la actividad. Sin embargo, la presencia de **un átomo de nitrógeno terciario protonado no es esencial** para

la actividad de los sesquiterpenos, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de inhibidores de Pgp conocidos.

En conclusión, la complejidad de las relaciones de estructura-actividad de estos inhibidores de Pgp es tal que **sólo modelos tridimensionales asistidos por ordenador podrán ser de alguna utilidad para predecir la actividad de los dihidro- β -agarofuranos basándose en su estructura.**

Reversion of Human Pgp-Dependent Multidrug Resistance by New Sesquiterpenes from *Zinowiewia costaricensis*

Francisco Muñoz-Martínez,^{†,‡} Cristina R. Mendoza,^{||,‡} Isabel L. Bazzocchi,^{||} Santiago Castanys,[†] Ignacio A. Jiménez,^{*,||} and Francisco Gamarro^{*,†}

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain, and Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna and Instituto Canario de Investigación del Cáncer, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

Received January 14, 2005

In an intensive study of South American medicinal plants, herein we report the isolation, structure elucidation and biological activity of fourteen new and five known dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from the leaves of *Zinowiewia costaricensis* (**1–19**). Their structures were determined by means of ¹H and ¹³C NMR spectroscopic studies, including homonuclear and heteronuclear correlation experiments. The absolute configurations of the new compounds were determined by CD studies, chemical correlations or biogenetic grounds. All the natural compounds and derivative **20** have been tested on human MDR1-transfected NIH-3T3 cells, to determine their ability to revert the multidrug resistance phenotype due to P-glycoprotein overexpression. Six compounds from this series (**1**, **8**, **11**, **12**, **13** and **14**) showed similar effectiveness to the classical P-glycoprotein modulator verapamil when reversing resistance to daunorubicin, but it is up to sixteen times greater than that of verapamil when reversing resistance to vinblastine. The structure–activity relationships are discussed.

Introduction

One of the most important rationales for isolation and structure elucidation of natural products is their potential pharmaceutical usefulness. Natural products have an excellent record as a source of new drugs and continue to provide new chemical entities to the market. In fact, many approved therapeutics as well as drug candidates are derived from natural sources. Additionally, natural products have been extensively used to elucidate complex cellular mechanisms, including signal transduction and cell cycle regulation, leading to the identification of important targets for therapeutic intervention.^{1,2}

Over the last 30 years, a large number of secondary metabolites exhibiting a wide range of bioactivity have been isolated from the *Celastraceae* family.³ In our search for biologically active metabolites from species of this family, *Zinowiewia costaricensis* was studied. The plant represents a genus of *Celastraceae* that is very poorly characterized from the chemical and ethnopharmacological point of view, and there is only one report of phytochemical analysis on *Z. costaricensis*.⁴

The sesquiterpene esters, based on the dihydro- β -agarofuran [5,11-epoxy-5 β ,10 α -eudesman-4-(14)-ene] skeleton, are chemotaxonomic indicators of the family,⁵ and they have attracted much interest due to their widespread occurrence in *Celastraceae* species and their broad range of biological activity. Recently, they have shown insecticidal,⁶ reversal multidrug resistance (MDR)

phenotype,⁷ antitumor-promoting activities⁸ and intestinal relaxant effects.⁹ These data along with their structural characteristics allow dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes to be considered as *privileged structures*.¹⁰

Intrinsic and acquired MDR in many human cancers may be due to the expression of the multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp).¹¹ There is strong evidence that Pgp is expressed both as an acquired mechanism (e.g., in leukemias, lymphomas, myeloma, and breast, and ovarian carcinomas)¹² and constitutively (e.g., in colorectal and renal cancers),¹³ and that its overexpression is of prognostic significance in many types of cancer.^{14,15} Inhibition of Pgp as a way of reversing MDR has been extensively studied for more than two decades,¹⁶ and hundreds of compounds that modulate the function of Pgp have been identified. However, it is now widely acknowledged that the major limitation of most of these agents was found to be the weak, nonselective inhibitory activity in clinical trials and toxicity at high doses,¹⁷ that together with unfavorable pharmacokinetic interactions,¹⁸ have prompted the search and development of a number of new molecules that are more potent and selective for the Pgp transporter. We have previously described¹⁹ that natural sesquiterpenes from *Celastraceae* plants are potent and specific inhibitors of Pgp and devoid of intrinsic toxicity in the concentration range of Pgp inhibition.

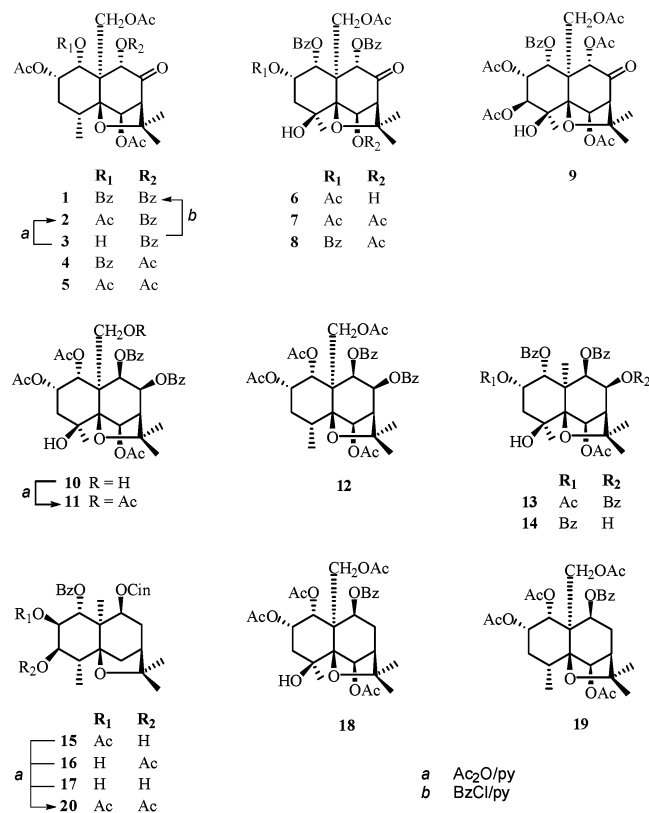
As a part of an intensive investigation into active metabolites as reversal agents of the Pgp-dependent MDR phenotype, we have focused our efforts in the characterization of new of these natural compounds as potential Pgp inhibitors. In the present work, we describe the phytochemical analysis of the ethanol extract of the leaves of *Z. costaricensis*, which yield

* To whom correspondence should be addressed. For I.A.J.: phone, 34-922-318576; fax, 34-922-318571; e-mail, ignadiaz@ull.es. For F.G.: phone, 34-958-181667; fax, 34-958-181632; e-mail, gamarro@ipb.csic.es.

[†] Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

^{||} Universidad de La Laguna.

[‡] Both authors contribute equally to this paper.

Scheme 1. Structure of Compounds 1–20 and Chemical Correlations

fourteen new (1–3, 5, 6 and 9–17) and five known (4,²⁰ 7,²¹ 8,²² 18²³ and 19²⁴) sesquiterpenes with a dihydro- β -agarofuran skeleton. Their structures were elucidated by means of ¹H and ¹³C NMR spectroscopic studies, including homonuclear (COSY and ROESY) and heteronuclear correlation (HSQC and HMBC) experiments. The absolute configurations of the new compounds was determined by CD studies, chemical correlations or biogenetic grounds. The known compounds were identified by spectroscopic methods and comparison with authentic samples or reported data. Furthermore, we have carried out the biological evaluation of all the natural compounds and the derivative 20, as reversers of the Pgp-dependent MDR in mammalian cells transfected with human MDR1, and showed that they were able to block Pgp-mediated daunorubicin (DNM) transport, to reverse cellular MDR to DNM and vinblastine (VNB) and to directly interact with the transporter in purified membranes from Pgp-overexpressing CH⁺B30 cells. These findings support the notion of sesquiterpenes as inhibitors of Pgp function with promising future prospects in the treatment of MDR malignancies due to overexpression of Pgp.

Results and Discussion

Repeated chromatography on Sephadex LH-20 and silica gel of the ethanol extract of the leaves of *Z. costaricensis* yielded, fourteen new sesquiterpenes (1–3, 5, 6 and 9–17), along with the known metabolites 4, 7, 8, 18 and 19 (Scheme 1).

Compound 1 showed the molecular formula C₃₅H₃₈O₁₂ by HREIMS. The IR spectrum showed absorption bands for ester groups at 1735 and 1747 cm⁻¹. The EIMS exhibited peaks consistent with losses of acetic acid (*m/z*

608 [M – CH₂CO]⁺) and benzoic acid (*m/z* 528 [M – PhCO₂H]⁺). This was confirmed by the ¹H NMR spectrum (Table 1), which also indicated the presence of signals for three acetyl groups at δ 2.07, 2.12 and 2.17 (3H, s, each one), 10 protons in the aromatic region for two benzoyl groups at δ 7.60 (4H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.37 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.18 (3H, m) and 6.95 (2H, t, *J* = 7.8 Hz) which were assured by ¹³C NMR data (Table 2). In addition, six methine protons at δ 5.51 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-2), 5.98 (2H, s, overlapping signals, H-1, H-9), 6.48 (1H, s, H-6), 3.12 (1H, s, H-7) and 2.49 (1H, m, H-4), and two sets of methylene protons at δ 4.84, 5.14 (2H, d_{AB}, *J* = 12.9 Hz, H-15) and 1.97 (1H, dd, *J* = 2.3, 14.3 Hz, H-3 α) and δ 2.49 (1H, m, H-3 β), were observed. On the basis of a ¹H–¹H COSY experiment, signals at δ 5.98, 5.51 and 1.97 and 2.49 were assigned to H-1, H-2 and H-3, respectively, and signals at δ 3.12, 6.48 and 5.98 were assigned to H-7, H-6 and H-9, respectively. The multiplicities and chemical shifts of the H-7 and H-9 signals suggested that they are α to a carbonyl group. A secondary methyl at δ 1.30 binding to a tertiary carbon at δ 33.3 in the ¹³C NMR spectrum (Table 2) and signals for two angular methyls were also observed. All these data indicate that compound 1 is a hexasubstituted dihydro- β -agarofuran sesquiterpene.

The relative stereochemistry of 1 was established on the basis of the coupling constants and confirmed by a ROESY experiment (Figure 1), showing NOE effects between H-1 to H-2 and H-9, H-15 to H-6 and Me-14, and between Me-13 to H-9. The chemical shifts for the carbons attached to protons were assigned according to a 2D heteronuclear HSQC experiment and the already known proton shifts. The regio substitution of the ester functions was determined by an HMBC experiment, showing a three-bond correlation between the carboxyl signals of the acetate groups at δ 169.1, 169.5 and 170.4 with signals at δ _H 5.51 (H-2), 6.48 (H-6) and 4.48, 5.14 (H-15), and the carboxyl signals of the benzoate groups at δ 165.0 and 165.1 were correlated with the signal at δ _H 5.98 (H-1 and H-9, overlapping signals). The carbonyl group was sited at C-8 as the signal at δ _C 197.9 was correlated with the signals at δ _H 3.12 (H-7) and 5.98 (H-9). The structure of compound 1 was accordingly established as 1 α ,9 α -dibenzoyloxy-2 α ,6 β ,15-triacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran.

The structure of compounds 2 and 3, which had the molecular formulas C₃₀H₃₆O₁₂ and C₂₈H₃₄O₁₁ (HREIMS), respectively, was elucidated by spectral methods, including IR, UV, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy (Tables 1 and 2). A detailed study of the NMR spectra and chemical correlations indicated that 3 is the 1-*O*-debenzoyl derivate of 1, and 2 is the 1-*O*-debenzoyl-1-*O*-acetyl derivate of 1.

The structure of compound 5 was elucidated by spectral methods (Tables 1 and 2), showing it was related to 1 with the most notable ¹H NMR differences being the disappearance of the two benzoate groups signals and the presence of two additional acetate groups signals. A semiselective HMBC technique was applied in order to obtain the complete ¹³C NMR assignments.²⁵

Compound 6 with the molecular formula C₃₃H₃₆O₁₂ was shown in a study of its IR, UV, ¹H and ¹³C NMR data (Tables 1 and 2) and two-dimensional ¹H–¹H

Table 1. ^1H NMR (δ , CDCl_3 , J in Hz in parentheses) Data of Compounds **1–3**, **5**, **6**, **10–17** and **20**

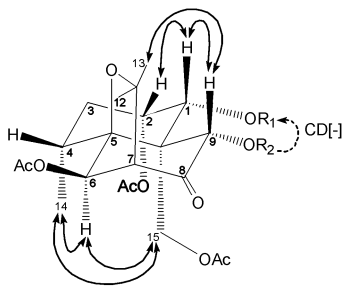
	H-1	H-2	H-3 α	H-3 β	H-6	H-7	H-8	H-9	H-15
1	5.98 s ^b	5.51 d (3.0)	1.97 dd (2.3, 14.3)	2.49 m ^b	6.48 s	3.12 s		5.98 s ^b	4.84, 5.14 d _{AB} (12.9)
2	5.65 d (3.2)	5.39 d (3.0)	1.86 d (15.0)	2.43 m ^b	6.45 s	3.10 s		5.87 s	4.68, 4.99 d _{AB} (12.9)
3	4.50 d (3.4)	5.26 m	1.84 m	2.33 m ^b	6.44 s	3.09 s		6.02 s	4.58, 4.98 d _{AB} (12.9)
5^a	5.91 d (3.0)	5.63 m		2.08 m ^b	6.58 s	2.96 s		5.95 s	4.74, 5.13 d _{AB} (12.8)
6	5.91 d (3.3)	5.47 m	2.21 m ^b	2.21 m ^b	5.37 d (5.1)	3.16 s		6.03 s	4.65, 5.24 d _{AB} (13.2)
9	6.03 d (3.0)	5.40 t (3.0)	4.93 d (2.8)		6.56 s	2.95 s		5.69 s	4.50, 5.14 d _{AB} (13.1)
10	5.59 d (3.2)	5.48 m	1.99 dd (3.0, 15.2)	2.20 m	6.54 s	2.66 d (3.1)	6.04 dd (3.1, 6.5)	5.94 d (6.5)	4.18, 4.41 d _{AB} (12.0)
11	5.64 d (3.6)	5.52 dd (3.3, 6.5)	2.03 dd (2.9, 15.1)	2.15 m	6.19 s	2.59 d (3.3)	6.06 dd (3.5, 6.5)	5.77 d (6.5)	4.48, 4.90 d (13.0)
12	5.77 d (3.4)	5.60 m	1.83 dd (2.4, 14.7)	2.43 m ^b	6.04 s	2.64 d (3.0)	6.01 dd (3.0, 6.5)	5.74 d (6.5)	4.44, 4.99 d _{AB} (12.8)
13	5.75 d (3.6)	5.69 m	2.10 dd (2.8, 15.1)	2.26 dd (3.2, 15.1)	5.78 s	2.63 d (3.0)	5.95 dd (3.0, 6.3)	5.53 d (6.3)	1.79 s ^b
14	5.84 d (3.6)	5.96 d (3.3)	2.24 dd (2.8, 15.3)		5.59 s	2.51 d (2.8)	4.69 m	5.30 d (6.2)	1.81 s
15	6.37 d (11.1)	5.33 dd (2.0, 11.1)	3.98 d (2.0)					4.76 t (3.6)	1.43 s
16	6.25 d (16.0)	4.09 m	4.89 s			1.99 s	2.10 m	4.80 d (5.3)	1.38 s
17	6.06 d (11.0)	3.89 m ^b	3.89 m ^b					4.78 d (5.9)	1.39 s
20	6.42 d (10.4)	5.46 dd (2.8, 11.0)	4.74 d (4.2)					4.74 d (6.7)	1.42 s

^a C_6D_6 . ^b Overlapping signals.

Table 2. ^{13}C NMR (δ , CDCl_3) Chemical Shift δ and J (Hz) Values^a of Compounds **1–3**, **5**, **6**, **9–17** and **20**

C	1	2	3	5 ^b	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	20
C-1	75.4 d	75.2 d	74.9 d	75.5 d	74.3 d	71.5 d	70.3 d	70.1 d	71.1 d	70.5 s	71.1 d	68.9 d	72.9 d	72.1 d	69.2 d
C-2	70.0 d	69.5 d	72.6 d	69.3 d	68.4 d	69.2 d	68.3 d	68.0 d	69.5 d	68.8 d	69.7 d	71.4 s	67.7 d	69.7 d	68.3 s
C-3	30.9 t	30.9 t	30.8 t	30.8 t	41.1 t	75.2 d	42.1 t	42.0 t	30.8 t	42.1 t	42.3 t	73.7 d	78.3 d	76.0 d	73.5 d
C-4	33.3 d	33.3 d	33.3 d	33.3 d	72.3 s	69.0 s	69.8 s	69.8 s	33.3 d	70.0 s	69.9 s	47.2 d	43.2 d	46.7 d	43.9 d
C-5	91.7 s	91.6 s	91.5 s	91.6 s	91.6 s	92.7 s	93.3 s	91.5 s	91.0 s	89.1 s	91.4 s	91.1 s	88.9 s	86.0 s	85.9 s
C-6	74.6 d	74.6 d	74.6 d	74.6 s	76.6 d	74.7 d	76.2 d	76.0 d	76.1 d	76.6 d	77.7 d	36.7 t	36.5 t	36.7 t	36.7 t
C-7	65.1 d	65.1 d	65.1 d	65.0 s	66.5 d	64.0 d	53.6 d	53.9 d	53.6 d	54.0 d	55.1 d	42.4 d	42.7 d	42.4 d	42.7 d
C-8	197.9 s	197.9 s	198.7 s	198.0 s	198.6 s	197.1 s	71.4 d	70.6 d	71.0 d	69.0 d	70.2 d	31.0 t	30.8 t	31.2 t	30.7 t
C-9	80.0 d	79.9 d	80.3 d	79.1 d	79.8 d	79.0 d	68.5 d	68.2 d	68.6 d	72.1 d	75.3 d	73.5 d	73.9 d	73.8 d	75.1 d
C-10	51.8 s	51.4 s	52.1 s	51.6 s	52.4 s	52.5 s	55.8 s	54.0 s	52.3 s	50.5 s	50.3 s	50.1 s	49.3 s	49.7 s	49.7 s
C-11	83.5 s	83.4 s	83.0 s	82.9 s	85.4 s	85.4 s	84.4 s	84.9 s	83.0 s	85.0 s	85.3 s	84.5 s	82.3 s	84.4 s	82.4 s
C-12	30.5 q	30.5 q	30.5 q	29.6 q	29.9 q	29.3 q	30.1 c	29.9 q	31.0 q	30.2 q	30.4 q	30.1 q	30.3 q	30.1 q	30.3 q
C-13	24.9 q	24.9 q	24.9 q	24.5 q	25.2 q	24.5 q	26.7 c	26.5 q	26.8 q	26.6 q	26.3 q	24.0 q	24.3 q	24.2 q	24.3 q
C-14	17.8 q	17.7 q	17.8 q	17.4 q	24.7 q	23.6 q	25.1 c	25.0 q	17.8 q	25.3 q	25.5 q	16.2 q	16.2 q	16.3 q	16.3 q
C-15	60.8 t	60.7 t	60.4 t	60.3 t	60.9 t	60.2 t	61.8 t	64.6 t	64.5 t	21.7 q	22.4 q	19.3 q	19.1 q	19.2 q	19.2 q

^a Data are based on DEPT, HMQC, and HMBC experiments. ^b C_6D_6 .

**Figure 1.** NOE effects (—) and CD exciton coupling (---) for compound **1**.

(COSY and ROESY) experiments to be a dihydro- β -agarofuran sesquiterpene with a carbonyl group, two benzoate groups, two acetate groups, and one secondary and one tertiary alcohol, which were located at positions 1 α , 2 α , 4 β , 6 β , 8, 9 α and 15 α by an HMBC experiment.

The structure of compound **9** with the molecular formula $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$ (HREIMS) was elucidated by spectroscopic methods (Tables 1 and 2), including 2D ^1H – ^1H and ^1H – ^{13}C correlations. An HMBC experiment allowed us to establish the substitution patterns, and the relative stereochemistry was resolved by analysis of the coupling constants and confirmed by a ROESY experiment.

Compound **10** was isolated as a colorless lacquer with the molecular formula $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{O}_{13}$ (HREIMS). The ^1H and ^{13}C NMR data (Tables 1 and 2) indicate it to be a

1,2,4,6,8,9,15-heptasubstituted- β -dihydroagarofuran sesquiterpene with one tertiary and one primary hydroxyl, three acetate and two benzoate groups. In its ^1H NMR spectrum an ABX₂ system was observed with signals at δ 5.59 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 5.48 (1H, m), 1.99 (1H, dd, $J = 3.0, 15.2$ Hz) and 2.20 (1H, m) assignable to protons H-1, H-2, H-3 α and H-3 β , respectively. In addition, an ABX system with signals at δ 2.66 (1H, d, $J = 3.1$ Hz), 6.04 (1H, dd, $J = 3.1, 6.5$ Hz) and 5.94 (1H, d, $J = 6.5$ Hz) assignable to protons H-7, H-8 and H-9, respectively, and a singlet at δ 6.54 assigned to the proton H-6, were also observed. The regioisomerism was established by a HMBC experiment, and the relative stereochemistry was determined on the basis of the coupling constants and the NOE effects from the ROESY experiment, showing significant cross-peaks between H-3 β to H-1 and H-2, and between H-6 to H-8, H-9, Me-14 and H-15. The structure of compound **11** was elucidated by spectral methods and chemical correlation with **10**; thus, acetylation of **10** gave a product whose spectroscopic data were identical to those of **11**.

The structure and absolute configuration of compounds **12–14** were elucidated by the study of their IR, UV, ^1H and ^{13}C NMR data (Tables 1 and 2) and 2D experiments, showing that the compounds were hexasubstituted-dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes, of which substituents were located at positions 1, 2, 6, 8, 9 and 15 for **12**, and at positions 1, 2, 4, 6, 8 and 9 for **13** and **14**, respectively. The HMBC experiments estab-

Table 3. Circular Dichroism Data of Compounds **1**, **6**, **9**, **10** and **12–15** (MeCN)

	λ_{ext} , nm ($\Delta\epsilon$)	λ_{ext} , nm ($\Delta\epsilon$)	$\Delta\epsilon = 0$	λ_{ext} , nm ($\Delta\epsilon$)
1	288.2 (+3.02)	237.9 (−3.88)	229.1	221.0 (+3.66)
6	288.8 (+1.97)	240.4 (−3.80)	231.1	224.2 (+3.06)
9	286.9 (+2.02)		243.8	
10		237.5 (−14.76)	226.4	220.7 (+4.85)
12		238.0 (−13.25)	227.6	221.6 (+5.64)
13		235.1 (+13.52)	226.2	220.9 (−6.52)
14		233.6 (+28.20)	220.7	216.8 (−2.68)
15		269.8 (+16.14)	240.8	226.8 (−13.11)

lished the regiosubstitution partners, and the relative stereochemistry was resolved by analysis of coupling constants and confirmed by ROESY experiments.

Compounds **15** and **16** were assigned the molecular formula $C_{33}H_{38}O_8$ by HREIMS. Their IR spectra showed absorption bands for hydroxyl and ester carbonyl groups, and the EIMS spectra revealed the presence of acetic, benzoic and cinnamic acids. This was confirmed by the 1H NMR spectra which indicated the presence of signals for one hydroxyl and one acetyl groups, and twelve protons in the aromatic region for one benzoyl and one cinnamoyl groups, which were confirmed by the ^{13}C NMR data. Cross-peaks in the HMBC experiments allowed us to establish the regiosubstitution partners, and the ROESY experiments enabled the relative configurations of the ester groups to be determined as 1α , 2β , 3β and 9β . The structure compound **17** was elucidated by spectral methods, including HREIMS, IR, UV, and NMR data (Tables 1 and 2), and comparison with those of **15** and **16**. When compounds **15–17** were acetylated, they yielded the same semisynthetic product **20**.

The natural compounds are based on the known polyhydroxylated skeletons 3,4,13-trideoxyevoninol (**1–5**),²⁶ 3,13-dideoxyevoninol (**6–8**),²¹ 13-deoxyevoninol (**9**),²⁷ 2 α ,4 β -dihydroxy-8-*epi*-celapanol (**13** and **14**),²⁸ 3-deoxy-maytol (**18**)²⁹ and 3,4-dideoxy-maytol (**19**).²⁹ Compounds **12** and **15–17** presented a type of substitution not previously reported, which we have named as zinowol and 4,6-dideoxymagellanol,²⁹ respectively. As a consequence, compounds **10** and **11**, whose basic polyhydroxy skeleton has not previously been assigned a name, were named as 4-hydroxyzinowol.

The absolute configuration of the new compounds were resolved by the dibenzoate chirality method, an extension of the circular dichroism exciton chirality method.³⁰ The dihedral angle between the different chromophores (benzoate and/or cinnamate) were calculated from J values data and molecular mechanics calculations using the PC model.³¹ Homochromophoric **1**, **6**, **10** and **12–14** and heterochromophoric **15** compounds were therefore considered suitable for a CD study, showing Davidoff-type split curves (Table 3). The absolute configuration of compound **9** was resolved by the octant rule,³² while those of compounds **2**, **3**, **11**, **16** and **17** were determined by chemical correlations. Biogenetic grounds allowed us to establish the absolute configuration of compound **5**.

The dihedral angle between the two benzoate chromophores was approximately 14° for **1**; its CD spectrum showed a split curve (Figure 1 and Table 3) with extremes at the right-hand-band wavelength, i.e.; the first Cotton effect at 252.2 nm ($\Delta\epsilon -0.01$) and the second

at 221.0 nm ($\Delta\epsilon +3.66$), defining the absolute configuration of **1** as (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1,9-dibenzoyloxy-2,6,15-triacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran. The absolute configuration can be also established from the same curve by application of the octant rule. In the CD curve a positive Cotton effect at 288.2 ($\Delta\epsilon +3.02$) is observed that corresponds to the $n-\pi^*$ transition of the carbonyl group at C-8. Chemical correlation between compounds **1**, **2** and **3** (Scheme 1) established the absolute configuration of **2** and **3**. Besides, the absolute configuration of compound **5**, related to **1**, could be determined as (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1,2,6,9,15-pentaacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran on the basis of biogenetic grounds. Compound **6** was suitable for CD analysis and showed a curve very similar to that of **1** (Table 3), defining the absolute configuration of **6** as (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-2,15-diacetoxy-1,9-dibenzoyloxy-4,6-dihydroxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran.

The absolute configuration of **9** was determined by CD studies, with the curve showing a positive Cotton effect at 286.9 nm ($\Delta\epsilon +2.02$) corresponding to the $n-\pi^*$ transition of the carbonyl group at C-8; application of the octant rule indicates that the absolute configuration of this product is (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1-benzoyloxy-4-hydroxy-2,3,6,9,15-pentaacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran.

Compound **10** had two benzoate chromophores at C-8 and C-9; its CD spectrum (Table 3) showed a first Cotton effect at 237.5 nm ($\Delta\epsilon -14.76$) and a second one at 220.7 nm ($\Delta\epsilon +4.85$). Its absolute configuration was accordingly established as (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-8,9-dibenzoyloxy-4,15-dihydroxy-1,2,6-triacetoxy-dihydro- β -agarofuran, while that of **11** was determined by chemical correlation with **10** (Scheme 1). The CD spectrum of **12** showed a split curve very similar to those of **10** (Table 3), and its absolute configuration was determined as (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-8,9-dibenzoyloxy-1,2,6,15-tetraacetoxy-dihydro- β -agarofuran.

The CD spectrum of **13** showed a split curve with a first Cotton effect at 235.1 nm ($\Delta\epsilon +13.52$) and a second one at 220.9 nm ($\Delta\epsilon -6.52$) due to the opposite 8,9 respect to 1,8 and 1,9 pairwise interactions added each other out, but did not cancel due to different intensities, supporting the absolute configuration as that ascribed to compound **13**. On the other hand, compound **14** showed a first Cotton effect at 233.6 nm ($\Delta\epsilon +28.20$) and a weak second one at 216.8 nm ($\Delta\epsilon -2.68$) due to the opposite pairwise interactions between the three chromophones together with the strong positive absorption overlaying background ellipticity.³⁰

The CD spectrum of **15** showed a split curve with a first positive and a second negative Cotton effects due to the couplings of the heterochromophores (benzoate and cinnamate) on C-1 α and C-9 β , defining its absolute configuration as (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxy-1-benzoyloxy-9-cinnamoyloxy-3-hydroxy-dihydro- β -agarofuran. The chemically correlated natural products **15–17** and the semisynthetic **20** all proved to have the same configuration (Scheme 1).

The efficiencies of the sesquiterpenes studied in the present work blocking the DNM transport activity of Pgp in intact NIH-3T3 MDR1 G-185 cells are shown in Figure 2. All of them demonstrated some inhibition activity against Pgp, but the most active compounds (**1**,

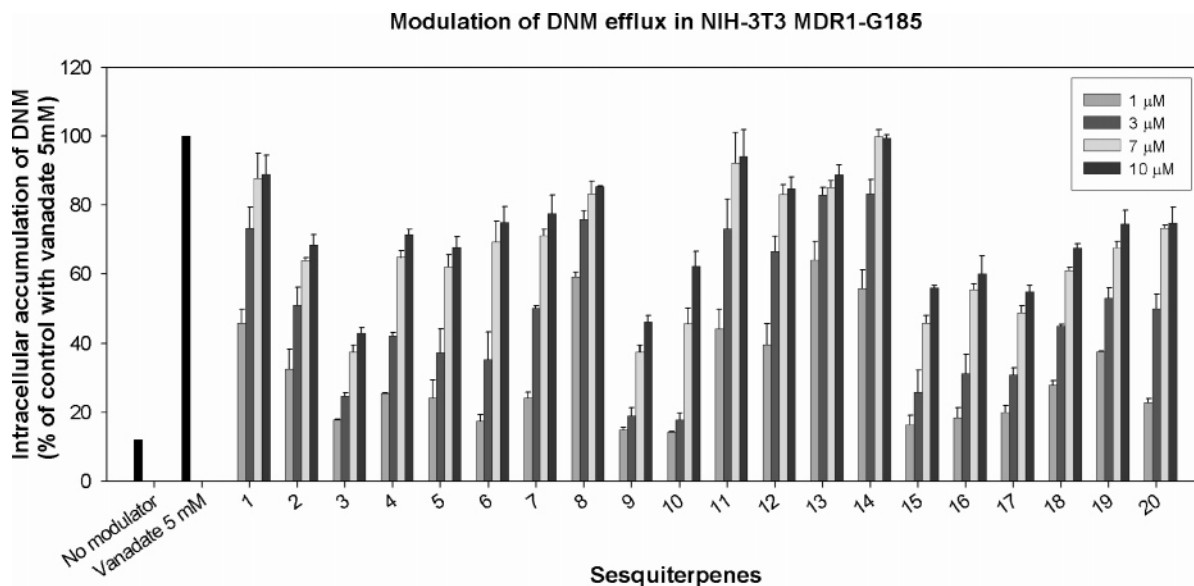


Figure 2. Inhibition of Pgp-mediated DNM transport across the cell membrane in intact NIH-3T3 MDR1 cells. The cells were coincubated with 10 μM DNM and 1, 3, 7 and 10 μM of sesquiterpenes, and the DNM retention was determined using a microplate assay as described in Experimental Section. DNM fluorescence intensity is expressed as relative fluorescence compared to a control with 5 mM vanadate, representing 100% Pgp inhibition.

Table 4. Inhibition of Pgp-Mediated DNM Transport by Sesquiterpenes in MDR1-Transfected NIH-3T3 Cells^a

sesquiterpene	K_i (μM)	sesquiterpene	K_i (μM)
1	1.633 \pm 0.249	11	1.737 \pm 0.238
2	2.543 \pm 0.056	12	1.710 \pm 0.179
3	18.391 \pm 5.132	13	0.913 \pm 0.083
4	5.740 \pm 2.874	14	1.209 \pm 0.214
5	9.826 \pm 4.149	15	8.463 \pm 1.493
6	3.967 \pm 0.422	16	4.247 \pm 1.066
7	3.009 \pm 0.117	17	6.940 \pm 3.640
8	1.034 \pm 0.064	18	4.392 \pm 0.115
9	6.517 \pm 0.810	19	2.357 \pm 0.504
10	7.041 \pm 0.328	20	2.717 \pm 0.295

^a Screening of sesquiterpenes inhibiting Pgp-mediated DNM transport in NIH-3T3 cells transfected with human MDR1 protein. The K_i was defined as the concentration of sesquiterpene that produce 50% inhibition of Pgp. K_i values were determined using the equation described in Experimental Section. Results are expressed as the mean \pm SD ($P < 0.001$) of 2–3 independent experiments performed in triplicate.

8, 11, 12, 13 and **14**) were able to block up to 70% of the drug transport activity of the protein at 3 μM , with K_i values (concentration that inhibit drug transport by 50%) of 1.63 \pm 0.25, 1.03 \pm 0.06, 1.74 \pm 0.24, 1.71 \pm 0.18, 0.91 \pm 0.08, 1.21 \pm 0.21 μM , respectively (see Table 4).

This efficiency in blocking the DNM transport activity of Pgp was correlated with their ability to sensitize MDR cells to the cytotoxic drugs DNM and VNB. In this regard, the above-mentioned six more-efficient sesquiterpenes blocking DNM efflux were able to reverse Pgp-dependent DNM resistance with reversion index values comparable to that of the classical Pgp modulator verapamil (Table 5). Moreover, using VNB instead of DNM, the efficiencies of sesquiterpenes reversing drug resistance were even better, with values up to 12 and 16 times higher than that of verapamil at 10 and 3 μM , respectively (Table 5). These results were not unexpected and correlate well with our previously published results¹⁹ reporting that sesquiterpenes revert much more efficiently the resistance to VNB than that to DNM, both due to Pgp overexpression. Regarding the

toxicities, these six sesquiterpenes showed less toxicity than verapamil for wild-type cells at the three tested concentrations (1, 3 and 10 μM) except **12** at 10 μM , which showed a toxicity ranging 50% of cell growth inhibition (Table 6). But curiously, these sesquiterpenes showed toxicities against MDR cells similar to that caused by verapamil or even higher; in fact, three sesquiterpenes (**1, 13** and **14**) were significantly more toxic at 10 μM to MDR cells than to drug sensitive cells (Table 6). This result also correlates to our previous work,¹⁹ showing that some sesquiterpenes were markedly more toxic to Pgp-overexpressing than to drug sensitive cells. The molecular basis of such an interesting phenomenon remains unknown, but a clear view can be drawn from these results: Pgp does not confer cross-resistance to sesquiterpenes, or, in other words, the sesquiterpenes are either poor Pgp substrates or not transported at all by the protein.

Finally, the above-mentioned sesquiterpenes were all able to compete with, in some extent, the photoaffinity labeling of Pgp by ³H-azidopine (Figure 3), which means that these natural compounds were interacting physically to the transporter, which explains their ability to block its drug transport activity and to revert Pgp-mediated cellular MDR.

The influence of the substitution pattern on the MDR reversal activity of the sesquiterpenes studied in this work was examined, using for comparisons the activities of sesquiterpenes as blockers of Pgp-mediated DNM transport (their values of K_i reported in Table 4), as well as the reversal index of the six most potent sesquiterpenes described in the present work (Table 5). The trends of the preliminary structure–activity relationship of this series of natural sesquiterpenes were as follows:

Comparison of the Pgp modulator activity of compounds **1–3** shows that compounds which contain an ester group on C-1 (**1** and **2**) were more potent than **3** with a hydroxyl group on this position. Moreover, the presence of benzoyl groups instead of acetyl groups at

Table 5. Drug Resistance Reversal Ability of Sesquiterpenes in MDR1-Transfected NIH-3T3 Cells

compounds	reversal index ^a with DNM ^b			reversal index with VNB ^c		
	10 μ M	3 μ M	1 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
verapamil ^d	10.20 \pm 1.60	9.55 \pm 1.20	6.12 \pm 1.10	18.76 \pm 5.00	13.18 \pm 0.24	6.21 \pm 1.10
1	11.75 \pm 1.53	6.21 \pm 0.55	4.21 \pm 0.62	233.37 \pm 15.30	213.64 \pm 5.50	5.72 \pm 0.60
8	16.64 \pm 3.23	15.41 \pm 4.26	9.93 \pm 2.87	33.1 \pm 6.74	8.09 \pm 2.98	7.31 \pm 2.18
11	11.13 \pm 1.80	10.78 \pm 1.10	4.26 \pm 0.41	233.60 \pm 18.10	102.17 \pm 11.20	6.23 \pm 0.40
12	16.73 \pm 0.90	8.05 \pm 0.70	2.66 \pm 0.43	94.23 \pm 9.30	14.42 \pm 2.70	2.65 \pm 0.40
13	12.72 \pm 1.35	9.55 \pm 0.64	8.26 \pm 0.78	90.39 \pm 8.60	87.04 \pm 6.90	16.55 \pm 1.80
14	15.86 \pm 1.70	11.13 \pm 1.20	6.32 \pm 0.45	57.32 \pm 7.10	41.23 \pm 5.20	5.38 \pm 0.40

^a The reversal index was defined as the ratio between the IC₅₀ of cells without sesquiterpene, and the IC₅₀ with sesquiterpene. IC₅₀ values were determined as described in Experimental Section. Results are expressed as the mean \pm SD ($P < 0.05$) of two independent experiments performed in quadruplicate. ^b The maximum reversal index with DNM (ratio between IC₅₀ for wild-type and MDR cells) is 27.5. ^c The maximum reversal index with VNB (ratio between IC₅₀ for wild-type and MDR cells) is 128.3. ^d Verapamil is a classical Pgp modulator used for comparison.

Table 6. Intrinsic Toxicity of Sesquiterpenes in Wild-type and Pgp MDR1-Transfected NIH-3T3 Cells

compounds	toxicity ^a in MDR1 cells			toxicity in wild-type cells		
	10 μ M	3 μ M	1 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
verapamil	23.33 \pm 4.20	16.50 \pm 4.00	10.40 \pm 3.50	31.70 \pm 2.80	21.90 \pm 2.50	4.50 \pm 5.50
1	37.76 \pm 1.50	18.97 \pm 1.00	6.67 \pm 2.00	29.40 \pm 1.50	11.03 \pm 1.00	0.00
8	38.06 \pm 4.29	29.10 \pm 2.33	16.29 \pm 3.13	35.01 \pm 5.76	28.93 \pm 4.37	17.67 \pm 4.12
11	23.68 \pm 2.80	5.46 \pm 1.10	2.82 \pm 0.90	25.13 \pm 2.80	13.68 \pm 1.10	7.18 \pm 0.90
12	21.38 \pm 2.00	13.28 \pm 1.50	0.06 \pm 0.04	49.83 \pm 5.90	13.25 \pm 1.50	5.73 \pm 0.40
13	32.47 \pm 3.20	19.25 \pm 1.60	7.30 \pm 1.10	20.60 \pm 3.20	15.56 \pm 1.60	6.24 \pm 1.10
14	29.25 \pm 2.70	2.36 \pm 2.10	0.40 \pm 1.00	25.21 \pm 2.70	17.09 \pm 2.10	3.50 \pm 1.00

^a The values of toxicity are expressed as percentage mean \pm SD ($P < 0.05$) of cell growth inhibition with respect to the control without sesquiterpene. Results are the mean of two independent experiments performed by quadruplicate.

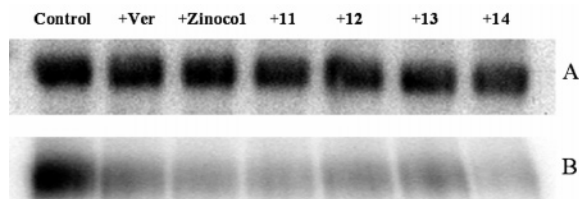


Figure 3. Modulation by sesquiterpenes of photoaffinity labeling with ³[H]-azidopine of Pgp in plasma membrane from CH₂B30 cells. Photolabeling was performed in the presence of 10 μ M sesquiterpenes (100-fold molar excess with respect to the probe) or the same concentration of verapamil for comparison. In a typical experiment, around 50 μ g of protein per sample was used, and Western blots using JSB-1 monoclonal antibody were also carried out in order to normalize the amount of Pgp loaded. Western blot (A) was developed by chemoluminescence using anti-mouse secondary antibody conjugated with peroxidase, and fluorography with ³[H]-azidopine (B) was developed after 7 days at -80°C .

positions C-1 and C-9 significantly improve their activities, as can be seen in compounds **1**, **2**, **4** and **5** (**1** being the most potent, **5** the least, and **2** and **4** having intermediate activity). Therefore, the ester carbonyl at C-1 and C-9 may favor interaction with the receptor, resulting in increased binding affinity. In addition, the presence of either a hydroxyl or an acetyl group at C-3 produces a decrease in activity, as deduced from the lower activities of compounds **9**, **15**, **16**, **17** and **20** and the much lower activity of **9** with respect to **6**, **7** and **8**. No straightforward conclusion can be drawn from the presence/absence of the hydroxy group at C-4 β , given that its presence seems to be important for the optimal reversal activity when compounds **1** and **7** are compared (K_i for inhibition of DNM transport: 1.63 \pm 0.25 and 3.01 \pm 0.12 μ M, respectively); however, compounds **11** and **12** (which differ only in such position) possess almost the same activity. Thus, a hydroxyl at C-4 may play a role in determining the compound activity

depending on the overall pattern of esterification (as well as on the nature of chemical groups) of the dihydro- β -agarofuran skeleton. The substituent at C-8 proved also to be important for the determination of the reversal activity. In general, the C-8-nonsubstituted compounds (**15**–**20**) are less active than the compounds with a carbonyl group (**1**–**9**), and these are less active than the hydroxyl- or ester-substituted compounds (**11**–**14**). The results indicated that a substituent on C-15 of the core is also important for the activity; thus, the presence of a hydroxyl group has a detrimental effect on the activity with respect to the presence of an acetate group (**10** versus **11**).

Conclusions

In summary, we have demonstrated that these new sesquiterpenes isolated from *Zinowewia costaricensis* are able to sensitize Pgp-overexpressing MDR cells against cytotoxic drugs. The sesquiterpenes with a dihydro- β -agarofuran skeleton possess a *privileged structure*, that confers upon them the ability to interact with Pgp and inhibit it with different efficiencies depending on the molecular groups attached to the basic scaffold. We observed some trends that seem to be important for high reversal activity in this class of compounds: (a) the overall esterification level of the compound; (b) the presence of two aromatic ester moieties; (c) the regio-substitution of the molecule seems to be an important element for affinity; (d) in contrast to the other reversal agents, the presence of a basic tertiary nitrogen atom is not essential for MDR reversal activity.

Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes have proven to be a very interesting class of natural products with a high reversal effect of the MDR phenotype mediated by Pgp. Due to this, further efforts are underway for the elucidation of the pharmacophore for these natural compounds, which would be of immense importance in

order to rationally design more potent and specific Pgp inhibitors, with potential use in the treatment of MDR cancers.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 automatic polarimeter, and the $[\alpha]_D$ values are given in 10^{-1} deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$. UV spectra were collected on a JASCO V-560 spectrometer. CD spectra were run on a JASCO J-600 spectropolarimeter. IR (film) spectra were recorded on a Bruker IFS 55 spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AMX-500, a Bruker Avance 400 or a Bruker Avance 300 spectrometer. EIMS and HREIMS were recorded on a Micromass Autospec spectrometer. Purification was performed using silica gel (particle size 40–63 μm , Merck, and HPTLC-Platten-Sil 20 UV₂₅₄, Panreac) and Sephadex LH-20 (Pharmacia) and was monitored by TLC (1500/LS 25 Schleicher and Schüll) foil.

Plant Material. *Zinowiewia costaricensis* Lundell (Celastraceae) was collected in August 1991 at Boquete in the Chiriquí, Panama. A voucher (FLORPAN 878) specimen is deposited in the herbarium of the Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, University of Panama.

Extraction and Isolation. The leaves of *Z. costaricensis* (858.0 g) were extracted with EtOH in a Soxhlet apparatus. Evaporation of the solvent under reduced pressure provided 96.0 g of crude extract, which was partitioned into a CH_2Cl_2 – H_2O (1:1, v/v) solution. Removal of the CH_2Cl_2 from the organic-soluble extract under reduced pressure yielded 26.0 g of residue, which was chromatographed on a silica gel column, using increasing polarity mixtures of *n*-hexanes–EtOAc as eluant to afford 10 fractions. Fractions 4–9 (10.2 g) were subjected to column chromatography over Sephadex LH-20 (*n*-hexane– CHCl_3 –MeOH, 2:1:1) and silica gel (CH_2Cl_2 –acetone of increasing polarity). Preparative HPTLC was used to purify the new compounds **1** (15.4 mg), **2** (11.7 mg), **3** (9.6 mg), **5** (1.5 mg), **6** (27.2 mg), **9** (8.0 mg), **10** (50.1 mg), **11** (52.3 mg), **12** (7.1 mg), **13** (13.5 mg), **14** (3.2 mg), **15** (70.7 mg), **16** (8.4 mg) and **17** (6.3 mg), in addition to the known compounds, **4** (2.2 mg), **7** (85.2 mg), **8** (14.7 mg), **18** (9.1 mg) and **19** (47.3 mg). Semisynthetic **20** (2.5 mg) was prepared by standard methods.

(1R,2S,4R,5S,6R,7R,9S,10S)-1,9-Dibenzoyloxy-2,6,15-triacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (1). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +32.0$ (*c* 0.2, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 229 (4.3) nm; IR γ_{max} (film) 2926, 2853, 1747, 1735, 1371, 1278, 1226, 1111, 758, 706 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.30 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, Me-14), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.58 (3H, s, Me-13), 2.07 (3H, s, OAc-15), 2.12 (3H, s, OAc-6), 2.17 (3H, s, OAc-2), 2.49 (2H, overlapping signals, H-3 β , H-4), OBz \times 2 [6.95 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.18 (3H, m), 7.37 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.60 (4H, d, $J = 8.2$ Hz)], for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-15 [20.7 (q), 170.4 (s)], OAc-2 [21.1 (q), 169.1 (s)], OAc-6 [21.3 (q), 169.5 (s)], OBz \times 2 [127.9 (2 \times d), 128.0 (2 \times d), 128.5 (s), 128.7 (s), 129.3 (2 \times d), 129.5 (2 \times d), 132.8 (s), 132.9 (s), 165.0 (s, $-\text{CO}_2$ -1), 165.1 (s, CO_2 -9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) m/z (%) 650 (M^+ , 1), 635 (1), 622 (1), 608 (1), 580 (1), 562 (24), 528 (13), 233 (8), 105 (100), 77 (19); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$: 650.23633. Found: 650.24251.

(1R,2S,4R,5S,6R,7R,9S,10S)-9-Benzoyloxy-1,2,6,15-tetraacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (2). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +21.3$ (*c* 0.1, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 231 (4.1) nm; IR γ_{max} (film) 2923, 2852, 1747, 1271, 1224, 1109, 1044, 711 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.26 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-14), 1.52 (3H, s, OAc-1), 1.53 (3H, s, Me-12), 1.54 (3H, s, Me-13), 2.05 (3H, s, OAc-15), 2.11 (3H, s, OAc-2), 2.15 (3H, s, OAc-6), 2.43 (1H, overlapping signals, H-4), OBz [7.45 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.58 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 8.0 (2H, d, $J = 8.3$ Hz)], for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-1 [20.3 (q), 169.7 (s)], OAc-15 [20.6 (q), 170.3 (s)], OAc-6 [21.1 (q), 169.0 (s)], OAc-2 [21.3 (q), 169.5 (s)], OBz [128.6 (2 \times d), 129.0 (s), 129.8 (2 \times d), 133.5 (d), 165.2 (s, CO_2 -9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) m/z (%) 588 (M^+ , 1), 573 (2), 560 (1), 546 (2), 528 (1), 518 (1), 500 (38), 466 (6), 455 (5), 279 (5), 233 (8),

105 (100), 77 (11); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$: 588.22068. Found: 588.22102.

(1R,2S,4R,5S,6R,7R,9S,10S)-9-Benzoyloxy-1-hydroxy-2,6,15-triacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (3). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +31.7$ (*c* 0.2, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (4.0) nm; IR γ_{max} (film) 3468, 2925, 2854, 1743, 1371, 1280, 1228, 1119, 1040, 710 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.23 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-14), 1.52 (6H, s, Me-12, Me-13), 2.06 (3H, s, OAc-15), 2.12 (3H, s, OAc-2), 2.14 (3H, s, OAc-6), 2.33 (1H, overlapping signals, H-4), OBz [7.44 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.56 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.98 (2H, d, $J = 7.4$ Hz)], for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-15 [20.6 (q), 170.3 (s)], OAc-6 [21.1 (q), 169.0 (s)], OAc-2 [21.4 (q), 171.1 (s)], OBz [128.3 (d), 128.4 (d), 129.9 (2 \times d), 129.4 (s), 133.3 (d), 166.1 (s, CO_2 -9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) m/z (%) 546 (M^+ , 1), 518 (1), 486 (3), 458 (3), 413 (1), 368 (2), 331 (2), 264 (2), 237 (3), 105 (100), 77 (14); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$: 546.21011. Found: 546.20084.

Acetylation of 3. A mixture of acetic anhydride (4 drops), compound **3** (1.5 mg) and 4-(dimethylamino)-pyridine (2.0 mg) in pyridine (2 drops), was stirred at r. t. for 16 h. The mixture was evaporated to dryness, and the residue was purified by preparative TLC using *n*-hexane/ethyl acetate (1:1), to give compound **2** (1.0 mg).

Benzoylation of 3. Compound **3** (3.0 mg) was dissolved in dry pyridine (0.5 mL), and benzoyl chloride (6 drops) and some crystals of 4-(dimethylamino)-pyridine were added under argon atmosphere. The mixture was heated at 60 °C for 15 h, poured over H_2O , extracted with EtOAc and purified on preparative TLC with a mixture of *n*-hexane/ethyl acetate (1:1) to give compound **1** (2.0 mg).

(1R,2S,4R,5S,6R,7R,9S,10S)-1,2,6,9,15-pentaacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (5). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +11.2$ (*c* 0.3, CHCl_3); IR γ_{max} (film) 3475, 2925, 2854, 1748, 1370, 1227, 1178, 1113, 1028, 758, 712 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.03 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, Me-14), 1.11 (3H, s, Me-12), 1.23 (3H, s, Me-13), 1.57 (3H, s, OAc-6), 1.69 (3H, s, OAc-2), 1.70 (3H, s, OAc-1), 1.82 (3H, s, OAc-9), 1.95 (3H, s, OAc-15), 2.08 (1H, m, overlapping signals, H-4), for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-9 [19.68 (q), 169.01 (s)], OAc-1 [20.01 (q), 169.02 (s)], OAc-6 [20.14 (q), 168.23 (s)], OAc-15 [20.15 (q), 169.24 (s)], OAc-2 [20.47 (q), 168.94 (s)], for other signals, see Table 2; MS (EI) m/z (%) 511 (M^+ – CH_3 , 3), 484 (7), 438 (100), 396 (17), 279 (20), 233 (18), 149 (4), 83 (39), 57 (49); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{12}$ (M^+ – CH_3): 511.18155. Found: 511.18190.

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-2,15-Diacetoxy-1,9-dibenzoyloxy-4,6-dihydroxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (6). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +18.4$ (*c* 0.3, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 229 (4.2) nm; IR γ_{max} (film) 3401, 2925, 2854, 1746, 1734, 1279, 1232, 1112, 756, 707 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.67 (3H, s, Me-13), 1.71 (3H, s, Me-12), 1.88 (3H, s, Me-14), 2.01 (3H, s, OAc-15), 2.15 (3H, s, OAc-2), 3.20 (1H, s, OH-4), 5.28 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, OH-6), OBz \times 2 [6.95 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.20 (3H, m), 7.38 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.57 (4H, m)], for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-15 [20.7 (q), 170.4 (s)], OAc-2 [21.1 (q), 169.1 (s)], OBz \times 2 [127.9 (2 \times d), 128.0 (2 \times d), 128.2 (s), 128.5 (s), 129.3 (2 \times d), 129.5 (2 \times d), 132.9 (d), 133.0 (d), 165.0 (s, CO_2 -1, CO_2 -9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) m/z (%) 624 (M^+ , 1), 606 (1), 564 (1), 546 (1), 502 (2), 442 (1), 414 (1), 352 (1), 249 (3), 105 (100), 77 (12); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$: 624.22068. Found: 624.21808.

(1R,2R,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-1-Benzoyloxy-4-hydroxy-2,3,6,9,15-pentaacetoxy-8-oxo-dihydro- β -agarofuran (9). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = -11.9$ (*c* 0.2, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 229 (3.9) nm; IR γ_{max} (film) 3446, 2924, 2852, 1739, 1272, 1226, 1097, 802, 713 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.54 (3H, s, Me-13), 1.60 (6H, s, Me-14, OAc-9), 1.65 (3H, s, Me-12), 2.02 (3H, s, OAc-15), 2.15 (3H, s, OAc-6), 2.17 (3H, s, OAc-3), 2.23 (3H, s, OAc-2), 3.31 (1H, s, OH-4), OBz [7.45 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.58 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.92 (2H, d, $J = 7.3$ Hz)], for other signals, see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ OAc-15 [20.5 (q), 169.8 (s)], OAc-2 [20.9 (q), 169.2 (s)], OAc-3 [20.9 (q), 168.1

(s), OAc-6 [21.3 (q), 169.3 (s)], OAc-9 [23.6 (q), 169.2 (s)], OBz [128.7 (2 × d), 128.9 (s), 129.7 (2 × d), 133.7 (d), 164.7 (s, CO₂-1)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 662 (M⁺, 1), 620 (1), 602 (1), 560 (2), 500 (1), 438 (1), 395 (2), 322 (2), 281 (2), 105 (100); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₂H₃₈O₁₅: 662.22107. Found: 662.22496.

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10S)-8,9-Dibenzoyloxy-4,15-dihydroxy-1,2,6-triacetoxy-dihydro-β-agarofuran (10). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = -20.0 (c 0.5, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 229 (4.4) nm; IR γ_{max} (film) 3512, 2929, 1744, 1731, 1368, 1280, 1232, 1090, 756, 709 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.57 (6H, s, Me-12, Me-14), 1.61 (3H, s, OAc-1), 1.77 (3H, s, Me-13), 2.03 (3H, s, OAc-2), 2.13 (3H, s, OAc-6), 3.03 (1H, s, OH-4), 3.41 (1H, s, OH-15), OBz × 2 [7.18 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.41 (3H, m), 7.56 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.67 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.90 (2H, d, *J* = 7.4 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-1 [20.4 (q), 169.6 (s)], OAc-2 [21.1 (q), 169.3 (s)], OAc-6 [21.5 (q), 169.9 (s)], OBz × 2 [128.5 (4 × d), 129.1 (s), 129.4 (s), 129.5 (2 × d), 130.2 (2 × d), 133.0 (d), 133.4 (d), 164.9 (s, CO₂-8), 165.7 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 653 (M⁺ - CH₃, 3), 635 (3), 591 (1), 548 (1), 531 (1), 486 (2), 471 (1), 444 (1), 426 (4), 105 (100), 77 (12); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₄H₃₇O₁₃ (M⁺ - CH₃): 653.22342. Found: 653.22203.

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10S)-8,9-Dibenzoyloxy-4-hydroxy-1,2,6,15-tetraacetoxy-dihydro-β-agarofuran (11). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = -11.7 (c 0.2, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 231 (4.5) nm; IR γ_{max} (film) 3554, 2925, 2852, 1748, 1368, 1280, 1229, 1093, 1045, 756, 709 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.52 (3H, s, Me-14), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.61 (3H, s, OAc-1), 1.80 (3H, s, Me-13), 2.12 (3H, s, OAc-2), 2.14 (3H, s, OAc-6), 2.40 (3H, s, OAc-15), 2.89 (1H, s, OH-4), OBz × 2 [7.22 (2H, m), 7.44 (3H, m), 7.58 (1H, m), 7.70 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.89 (2H, d, *J* = 7.5 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-1 [20.2 (q), 169.2 (s)], OAc-2 [21.1 (q), 169.5 (s)], OAc-6 [21.2 (q), 169.8 (s)], OAc-15 [21.3 (q), 170.5 (s)], OBz × 2 [128.2 (2 × d), 128.3 (2 × d), 128.8 (s), 129.2 (s), 129.5 (2 × d), 130.3 (2 × d), 133.5 (d), 133.1 (d), 164.8 (s, CO₂-8), 165.4 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 695 (M⁺ - CH₃, 6), 650 (3), 590 (10), 573 (18), 513 (2), 471 (2), 202 (14), 105 (100), 77 (9); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₆H₃₉O₁₄ (M⁺ - CH₃): 695.23398. Found: 695.23653.

Acetylation of 10. When compound **10** (1.7 mg) was acetylated under the same conditions already described for compound **3**, **11** (1.3 mg) was obtained.

(1R,2S,4R,5S,6R,7R,8S,9R,10S)-8,9-Dibenzoyloxy-1,2,6,15-tetraacetoxy-dihydro-β-agarofuran (12). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +93.3 (c 0.2, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 230 (4.4) nm; IR γ_{max} (film) 2925, 2853, 1747, 1368, 1280, 1229, 1093, 1027, 757, 710 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.22 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-12), 1.59 (3H, s, OAc-1), 1.72 (3H, s, Me-13), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.13 (3H, s, OAc-2), 2.38 (3H, s, OAc-15), 2.43 (1H, overlapping signals, H-4), 2 × OBz [7.21 (3H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (3H, m), 7.57 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.70 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.90 (2H, d, *J* = 7.3 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-1 [20.2 (q), 169.2 (s)], OAc-2 [21.1 (q), 169.5 (s)], OAc-6 [21.2 (q), 169.8 (s)], OAc-15 [21.3 (q), 170.5 (s)], OBz × 2 [128.2 (2 × d), 128.3 (2 × d), 128.8 (s), 129.2 (s), 129.5 (2 × d), 130.3 (2 × d), 133.5 (d), 133.1 (d), 164.8 (s, CO₂-8), 165.4 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 679 (M⁺ - CH₃, 9), 652 (14), 634 (2), 577 (2), 413 (2), 365 (2), 159 (1), 105 (100), 77 (9); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₇H₄₂O₁₃ (M⁺ - CH₃): 679.23907. Found: 679.24165.

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10S)-2,6-Diacetoxy-4-hydroxy-1,8,9-tribenzoyloxy-dihydro-β-agarofuran (13). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +35.3 (c 0.3, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 230 (4.5) nm; IR γ_{max} (film) 3555, 2925, 2853, 1730, 1270, 1233, 1110, 755, 708 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.55 (3H, s, Me-14), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.79 (3H, overlapping signals, Me-13), 2.00 (3H, s, OAc-2), 2.17 (3H, s, OAc-6), 2.96 (1H, s, OH-4), OBz × 3 [7.22 (5H, m), 7.33 (2H, m), 7.43 (2H, m), 7.52 (3H, m), 7.70 (3H, m)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-2 [21.1 (q), 169.4 (s)], OAc-6 [21.5 (q), 169.9

(s)], OBz × 3 [128.0 (4 × d), 128.2 (2 × d), 129.0 (s), 129.2 (2 × s), 129.3 (2 × d), 129.5 (2 × d), 130.1 (2 × d), 132.8 (d), 133.1 (2 × d), 164.8 (s, CO₂-8), 165.0 (s, CO₂-1), 165.1 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 714 (M⁺, 1), 699 (2), 594 (7), 577 (10), 532 (1), 472 (2), 202 (15), 105 (100), 77 (10); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₄₀H₄₂O₁₂ (M⁺): 714.26763. Found: 714.27170.

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-6-Acetoxy-4,8-dihydroxy-1,2,9-tribenzoyloxy-dihydro-β-agarofuran (14). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +12.7 (c 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 229 (4.2) nm; IR γ_{max} (film) 3423, 2924, 2852, 1729, 1272, 1114, 802, 711 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.55 (3H, s, Me-12), 1.60 (3H, s, Me-14), 1.69 (3H, s, Me-13), 2.16 (3H, s, OAc-6), 3.03 (1H, s, OH-4), OBz × 3 [7.18 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.40 (7H, m), 7.83 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.90 (2H, d, *J* = 7.7 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-6 [21.6 (q), 170.3 (s)], OBz × 3 [128.0 (4 × d), 128.2 (2 × d), 129.0 (s), 129.2 (2 × s), 129.3 (2 × d), 129.5 (2 × d), 130.1 (2 × d), 132.8 (d), 133.1 (2 × d), 165.1 (s, CO₂-2), 165.6 (s, CO₂-1), 167.4 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 657 (M⁺ - CH₃, 1), 535 (4), 490 (3), 386 (5), 322 (3), 202 (4), 167 (5), 105 (100); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₇H₃₇O₁₁ (M⁺ - CH₃): 657.23359. Found: 657.23052.

(1R,2R,3R,4R,5S,7R,9S,10R)-2-Acetoxy-1-benzoyloxy-9-cinnamoyloxy-3-hydroxy-dihydro-β-agarofuran (15). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +131.1 (c 0.2, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 280 (4.7), 224 (4.8) nm; IR γ_{max} (film) 3467, 2924, 1736, 1313, 1271, 1166, 1028, 711 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.25 (3H, d, *J* = 7.9 Hz, Me-14), 1.28 (3H, s, Me-12), 1.42 (3H, s, Me-13), 2.03–2.29 (6H, m, H-4, 2 × H-6, H-7, 2 × H-8), 6.50 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, OCin-9), OBz, OCin [7.29 (2H, m), 7.40 (5H, m), 7.58 (2H, m), 7.78 (2H, m)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-2 [20.9 (q), 170.9 (s)], OBz, OCin [118.9 (d), 128.2 (2 × d), 128.3 (2 × d), 129.3 (2 × d), 129.5 (s), 130.2 (d), 132.7 (d), 134.8 (s), 144.6 (d), 164.9 (s, CO₂-1), 166.2 (s, CO₂-9)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 562 (M⁺, 14), 502 (1), 440 (4), 414 (11), 292 (5), 250 (11), 232 (15), 131 (87), 105 (100), 77 (19); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₃H₃₈O₈ (M⁺): 562.25667. Found: 562.25961.

(1R,2R,3R,4R,5S,7R,9S,10R)-3-Acetoxy-1-benzoyloxy-9-cinnamoyloxy-2-hydroxy-dihydro-β-agarofuran (16). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +25.0 (c 0.4, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 276 (4.3), 224 (4.5) nm; IR γ_{max} (film) 3487, 2920, 2850, 1726, 1280, 1247, 1109, 757, 710 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.14 (3H, s, Me-12), 1.20 (3H, d, *J* = 8.1 Hz, Me-14), 1.32 (3H, s, Me-13), 2.23 (3H, s, OAc-3), 2.41 (1H, m, H-4), 6.25 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, OCin-9), OBz, OCin [7.45 (9H, m), 7.82 (2H, d, *J* = 7.1 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-3 [21.6 (q), 171.1 (s)], OBz, OCin [118.2 (d), 128.1 (4 × d), 128.8 (2 × d), 129.5 (2 × d), 129.8 (s), 130.1 (d), 133.0 (d), 134.7 (s), 145.0 (d), 166.0 (s, CO₂-9), 168.0 (s, CO₂-1)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 562 (M⁺, 2), 440 (1), 414 (3), 399 (2), 292 (2), 131 (47), 105 (100); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₃H₃₈O₈ (M⁺): 562.25667. Found: 562.25746.

(1R,2R,3R,4R,5S,7R,9S,10R)-1-Benzoyloxy-9-cinnamoyloxy-2,3-dihydroxy-dihydro-β-agarofuran (17). Colorless lacquer; [α]_D²⁰ = +1.6 (c 0.5, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 276 (4.0), 224 (4.2) nm; IR γ_{max} (film) 3462, 2926, 1725, 1275, 1169, 1113, 758, 711 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.21 (3H, d, *J* = 8.0 Hz, Me-14), 1.27 (3H, s, Me-12), 1.41 (3H, s, Me-13), 2.08–2.27 (2H, overlapping signals, H-7, H-4), 6.36, (1H, d, *J* = 16.0 Hz, OCin-9), OBz, OCin [7.29 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.40 (4H, m), 7.52 (3H, m), 7.82 (2H, d, *J* = 7.9 Hz)], for other signals, see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OBz, OCin [118.5 (d), 128.1 (2 × d), 128.2 (2 × d), 128.8 (2 × d), 129.5 (2 × d), 130.1 (d), 130.4 (s), 132.7 (d), 134.7 (s), 144.8 (d), 166.1 (s, CO₂-9), 166.7 (s, CO₂-1)], for other signals, see Table 2; MS (EI) *m/z* (%) 520 (M⁺, 2), 487 (1), 398 (2), 322 (2), 251 (11), 131 (73), 105 (100); HRMS (EI) *m/z* Calcd for C₃₁H₃₆O₇ (M⁺): 520.24610. Found: 520.25285.

Preparation of 20. When compound **15** (2.0 mg), **16** (1.7 mg) or **17** (1.5 mg), were acetylated under the same conditions already described for compound **3**, a common product, **20** (1.5 mg, 1.2 mg and 1.0 mg, respectively), was obtained.

(1R,2R,3R,4R,5S,7R,9S,10R)-1-Benzoyloxy-9-cinnamoyloxy-2,3-diacetoxy-dihydro- β -agarofuran (20). Colorless lacquer; $[\alpha]_D^{20} = +53.5$ (c 0.4, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 277 (4.4), 223 (4.6) nm; IR γ_{max} (film) 2925, 2852, 1733, 1314, 1275, 1168, 1028, 757, 712 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.15 (3H, s, Me-12), 1.27 (3H, s, Me-14), 1.35 (3H, s, Me-13), 1.81 (3H, s, OAc-2), 2.23 (3H, s, OAc-3), 2.00–2.36 (6H, overlapping signals, H-4, H-6, H-7, H-8), 6.47 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, OCin-9), OBz, OCin [7.26–7.61 (8H, m), 7.78 (2H, d, $J = 7.2$ Hz)]; ¹³C NMR (CDCl₃) δ OAc-2 [20.8 (q), 170.6 (s)], OAc-3 [21.6 (q), 171.4 (s)], OBz, OCin [118.8 (d), 128.2 (2 \times d), 128.3 (2 \times d), 128.8 (2 \times d), 129.3 (2 \times d), 130.0 (s), 130.1 (d), 132.8 (d), 134.8 (s), 144.6 (d), 165.2 (s, CO₂-1), 166.3 (s, CO₂-9)]; MS (EI) m/z (%) 604 (M⁺, 25), 473 (8), 456 (6), 413 (10), 291 (7), 231 (12), 131 (100), 105 (6); HRMS (EI) m/z Calcd for C₃₅H₄₀O₉ (M⁺): 604.26723. Found: 604.27025.

Biological Assays. 1. Chemicals. Vinblastine (VNB), verapamil, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium ortho-vanadate and colchicine were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Daunorubicin (DNM) was from Pfizer (Madrid, Spain). [³H]-Azidopine (52 Ci/mmol) and NAMP100 amplify solution for fluorographies were from Amersham Biosciences (Barcelona, Spain). The JSB-1 monoclonal antibody, directed against mammalian P-glycoprotein (Pgp), was from Calbiochem (Madrid, Spain).

2. Cell Cultures. The NIH-3T3 drug-sensitive parental cell line, the NIH-3T3 MDR1-G185 cell line transfected with human MDR1-G185, the parental, drug-sensitive AuxB1 cell line and the colchicine-selected line CH⁺B30 were cultured as described previously.¹⁹ Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and cell culture media were from Invitrogen (Barcelona, Spain).

3. Modulation of DNM Efflux in the Microplate Test. The sesquiterpenes studied in the present work were previously screened for their ability to block the Pgp-dependent DNM efflux in a microplate assay. The day before the experiment parental, drug-sensitive cells and MDR1 cells were both plated at a density of 2×10^4 cells/well in 96-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark). After 24 h incubation, when cells were forming a 90% confluent monolayer in all the wells, the original medium was removed and the cells were incubated in the presence/absence of 1, 3 and 10 μ M sesquiterpenes in DMEM + 10% FBS with 10 μ M DNM for 2 h at 37 °C. We tested by performing a time-dependent DNM accumulation curve (not shown) that this incubation period was the minimum necessary to get maximal intracellular accumulation of DNM in MDR1 cells treated with 5 mM ortho-vanadate (ATPase activity inhibitor of Pgp) with respect to untreated cells. This DNM accumulation value was considered as 100% of intracellular DNM accumulation (or 100% inhibition of Pgp). To calculate the K_i for inhibition of DNM efflux, the results with sesquiterpenes were normalized to that value of maximal Pgp inhibition, plotted and fitted to the Hill equation for allosteric interactions, using SigmaPlot 2000 software: $i = (I_{max} \times S^n)/(K_i + S^n)$; where i is the inhibition of DNM efflux at a given sesquiterpene concentration, I_{max} is the maximal inhibition, caused by 5 mM vanadate, S is the concentration of sesquiterpene, and n is the Hill coefficient.

After the incubation step with DNM, the fluorescent probe was removed and the monolayers were washed twice with cell culture medium + 10% FBS in order to remove any trace of extracellular DNM. Finally, 50 μ M of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, SDS 0.2%) were added to each well and incubated at 4 °C overnight in the dark. The accumulated intracellular fluorescence due to DNM ($\lambda_{excitation} = 480$ nm; $\lambda_{emission} = 590$ nm) was measured in a microplate spectrofluorometer "SpectraMax Gemini EM" (Molecular Devices, Sunnyvale CA) using the SoftmaxPro 4.3 software (also from Molecular Devices).

4. Reversion of Pgp-Dependent DNM and VNB Resistance. The dose–response curves of NIH-3T3 and NIH-3T3 MDR1-G185 cells were determined by the MTT colorimetric assay³³ as described previously.¹⁹ To assess the chemosensitizing effect of the best sesquiterpenes blocking the DNM efflux

activity of Pgp (Zinocos 1, 11, 12 13 and 14), both drug-sensitive and MDR1 cells were exposed to increasing concentrations of DNM or VNB (up to 500 ng/mL) in the presence/absence of fixed concentrations (1, 3 and 10 μ M) of each sesquiterpene. Dose–response curves were generated by non-linear regression (using SigmaPlot 2000 for Windows, SPSS Inc.) of the data points to a four-parameter logistic curve, to determine the IC₅₀ (defined as the drug concentration that inhibit cell growth by 50%) for DNM and VNB at each sesquiterpene concentration. Reversion index for a given sesquiterpene at a given concentration was the ratio between the IC₅₀ for cells without sesquiterpene and the IC₅₀ with sesquiterpene.

5. Plasma membrane Preparation and [³H]-Azidopine Photoaffinity Labeling. Plasma membrane vesicles from the colchicine-selected MDR Chinese hamster ovary cell line CH⁺B30 were isolated as previously described.³⁴ Photoaffinity labeling of Pgp in CH⁺B30 plasma membrane vesicles with [³H]-azidopine (100 nM, 52 Ci/mmol) was carried out as described,³⁵ in the presence of 100-fold molar excess of sesquiterpenes (10 μ M). Membrane proteins were analyzed by SDS–PAGE on a 9% gel, followed by fluorography. Briefly, the polyacrilamide gels were immersed 30 min in fluorographic reagent (NAMP 100 from Amersham), subsequently dried for 1 h at 80 °C under vacuum, and placed inside a cassette with a photographic film (AGFA Cuprix RP2) for 4–7 days at –80 °C. Parallel samples were run in SDS–PAGE gels to perform Western blot and immunodetection of Pgp with JSB-1 monoclonal antibody.

Acknowledgment. This study was supported by the Spanish Grants SAF-2003-04200-CO2-01 and BQU2003-09558-CO2-01. F.M.M. is the recipient of research fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (F.P.U. AP2000-0264). We thank Prof. Jesús Trujillo Vázquez for recording the CD curves, and Prof. Mahabir Gupta for providing the plant material. C.R.M. also thanks the Banco Santander for financial support. We also thank Dr. Ira Pastan (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD) for providing the NIH-3T3 and NIH-3T3 MDR-G185 cell lines and Dr. Frances J. Sharom (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada) for providing the drug-sensitive AuxB1 and the colchicine-selected line CH⁺B30 cell lines. Finally, we acknowledge Pfizer (Madrid, Spain) for providing the daunorubicin used in this work.

Supporting Information Available: $[\alpha]_D$, UV, CD, IR, ¹H and ¹³C NMR, MS and HRMS data and ¹H NMR spectra for the new compounds **1–3**, **5**, **6**, **9–17** and **20**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022–1037.
- Lee, K.-H. Current developments in the discovery and desing of new drug candidates from natural products leads. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 273–283.
- Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 43–59.
- Castro, V.; Arias, R.; Calzada, J.; Poveda, L. Preliminary study of *Zinowiewia costaricensis* Lundell. *Ingeniería y ciencia química.* **1982**, *6*, 156.
- Brüning, R.; Wagner, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. *Phytochemistry.* **1978**, *17*, 1821–1858.
- Núñez, M. J.; Guadaño, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; González-Coloma, A.; Bazzocchi, I. L. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 14–18.

- (7) Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. SAR studies of dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576–587.
- (8) Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Núñez, M. J.; Mukainaka, T.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Ravelo, A. G. Absolute configuration of sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzzi* and their inhibitory effects on Epstein–Barr virus early antigen activation in Raji cells. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047–1050.
- (9) Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; Izzo, A. A.; De Marino, S.; Capasso, F.; Ferrara, L.; Longo, R.; Zollo, F. New sesquiterpenes with intestinal relaxant effect from *Celastrus paniculatus*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 652–656.
- (10) Horton, A. D.; Bourne, T. G.; Smythe, M. L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893–930.
- (11) Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
- (12) Han, K.; Kahng, J.; Kim, M.; Lim, J.; Kim, Y.; Cho, B.; Kim, H. K.; Min, W. S.; Kim, C. C.; Lee, K. Y.; Kim, B. K.; Kang, C. S. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukaemia. *Acta Haematol.* **2000**, *104*, 174–180.
- (13) Fojo, A. T.; Ueda, K.; Slamon, D. J.; Poplack, D. G.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. Expression of multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 265–269.
- (14) Leith, C. P.; Kopecky, K. J.; Chen, I. M.; Eijdem, L.; Slovak, M. L.; McConnell, T. S.; Head, D. R.; Weick, J.; Grever, M. R.; Appelbaum, F. R.; Willman, C. L. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* **1999**, *94*, 1086–1099.
- (15) van der Kolk, D. M.; de Vries, E. G.; van Putten, W. J.; Verdonck, L. F.; Ossenkoppele, G. J.; Verhoef, G. E.; Vellenga, E. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3205–3214.
- (16) Thomas, H.; Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **2003**, *10*, 159–165.
- (17) Ferry, D. R.; Traunecker, H.; Kerr, D. J. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumors. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 1070–1081.
- (18) Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265–283.
- (19) Muñoz-Martínez, F.; Lu, P.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jimenez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom, F. J.; Gamarro, F.; Castanys, S. Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130–7138.
- (20) Hohmann, J.; Nagy, G.; Günther, G. A sesquiterpene polyol ester from *Euonymus sachalinensis*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 503–505.
- (21) González, A. G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. Minor sesquiterpenes from *Maytenus canariensis* with insecticidal and antifeedant activity. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6637–6644.
- (22) González, A. G.; Rodríguez, F. M.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G. New terpenoids from *Maytenus blepharodes*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 48–51.
- (23) Hohmann, J.; Dini, Z.; Pelczer, I.; Jerkovich, G. Sesquiterpene esters from *Euonymus nanus*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1267–1270.
- (24) González, A. G.; Núñez, M. P.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G.; Jiménez, I. A. Minor sesquiterpenes from *Maytenus chubutensis*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 474–478.
- (25) Wilker, W.; Leibfrits, D.; Kersebaum, R.; Bermel, W. Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 287–292.
- (26) Taylor, I. Q.; Whathson, Jr. Polyhydroxy components of Celastraceae alkaloids. The structure of Euonyminol, C₁₅H₂₆O₁₀. *Acta Crystallogr.* **1977**, *B33*, 3176.
- (27) González, A. G.; Núñez, M. P.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. Minor sesquiterpenes from *Maytenus magellanica*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 2114–2119.
- (28) Kupchan, S. M.; Smith, R. M. Maytoline, maytine, and maytolidine, novel nicotinoyl sesquiterpene alkaloids from *Maytenus serrata*. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 115–118.
- (29) Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4668–4676.
- (30) Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroism Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; University Science Books: Mill Valley, CA, 1983.
- (31) PC Model from Serena Software, P.O. Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076.
- (32) Núñez, M. J.; Cortés-Selva, F.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Gavin, J. A. Absolute configuration and complete assignment of ¹³C NMR data for new sesquiterpenes from *Maytenus chiapensis*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 572–574.
- (33) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (34) Doige, C. A.; Sharom, F. J. Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr. Purif.* **1991**, *2*, 256–265.
- (35) Safa, A. R.; Glover, C. J.; Sewell, J. L.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L.; Felsted, R. L. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7884–7888.

JM058003F

Artículo 3. Insights into the molecular mechanism of action of *Celastraceae* sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human P-glycoprotein

Francisco Muñoz-Martínez, Carolina P. Reyes, Antonio L. Pérez-Lomas, Ignacio A. Jiménez, Francisco Gamarro y Santiago Castanys

Enviado a: *Biochimica et Biophysica Acta (Biomembranes)*

En nuestro trabajo previo (ver Artículo 1), demostramos que los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de *Celastraceae* se unen a los dominios transmembrana (TMDs) de la Glicoproteína-P humana (Pgp), y funcionan como inhibidores no competitivos de su actividad de transporte de fármacos, capaces de revertir *in vitro* el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células tumorales. Pero aún quedaba por esclarecer aspectos importantes de su mecanismo de acción, tales como si Pgp es capaz de conferir resistencia cruzada a sesquiterpenos (esto es, si son o no transportados por la bomba), si estos compuestos tienen algún efecto sobre la expresión de Pgp en células, o la identidad del sitio(s) de unión de sesquiterpenos en los TMDs y su relación con los de otros moduladores clásicos.

Para determinar lo primero, en colaboración con el laboratorio de los Doctores Ignacio A. Jiménez e Isabel L. Bazzocchi, **sintetizamos un derivado fluorescente de un sesquiterpeno activo natural** para hacer con él estudios de acumulación y eflujo en células intactas. Primero, comprobamos que el derivado fluorescente conservaba la actividad revertidora de la molécula parental, lo que sugería que conservaba el mecanismo de acción de un sesquiterpeno natural. Después, demostramos con esta sonda fluorescente que Pgp no es capaz de afectar significativamente el flujo de entrada ni de salida de la sonda en células intactas que sobre-expresan la proteína de manera moderada. En cambio, en células con una sobre-expresión de Pgp mucho mayor (hasta un 5% de la proteína total de membrana), Pgp era apenas capaz de disminuir la acumulación de la sonda en dichas células, pero sí de acelerar más acusadamente su expulsión activa de ellas, aunque mucho menos que en comparación con el sustrato clásico de Pgp

daunorubicina. Esto sugiere que **el derivado fluorescente de sesquiterpeno se comporta como un sustrato de Pgp muy pobre, cuyo flujo de entrada y de salida de las células por difusión sólo se ve afectado por la bomba cuando ésta se sobre-expresa hasta niveles muy elevados.** Esto concuerda con la **incapacidad de Pgp para conferir resistencia cruzada a sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos**, que también demostramos en este trabajo. Del mismo modo, otros homólogos humanos de Pgp (las bombas de fármacos **MRP1, MRP2 y BCRP**) son **igualmente incapaces** de transportar eficientemente sesquiterpenos a través de las membranas celulares.

Por otra parte, los más potentes sesquiterpenos naturales inhibidores de Pgp **no modifican la expresión de la proteína**, tal y como hemos confirmado usando una serie de líneas celulares MDR cuyo principal mecanismo de resistencia a fármacos es la sobre-expresión de Pgp.

Finalmente, mediante un análisis enzimológico de las interacciones entre pares de moduladores durante la inhibición de la actividad de transporte de fármacos de Pgp, hemos determinado que los sesquiterpenos naturales poseen **al menos dos sitios de unión en los TMDs, de alta y baja afinidad**, respectivamente, y al menos uno de ellos solapa físicamente con los sitios de unión de los moduladores clásicos verapamil y ciclosporina A. En cambio, es físicamente diferente del sitio de unión del sustrato vinblastina, de los dos sitios de unión de progesterona (uno en los TMDs y otro en los dominios de unión de ATP), y del sitio de unión del inhibidor de 3ª generación GF120918.

Todos estos hallazgos completan, pues, nuestro trabajo de caracterización del mecanismo de acción molecular de dihidro- β -agarofuranos como inhibidores específicos de Pgp. Las conclusiones globales apuntan a esta familia de compuestos como poseedora de **una estructura molecular privilegiada que podría explotarse para el diseño racional de fármacos** con potencial aplicación terapéutica en la inhibición de Pgp, tanto en tejidos sanos como en células tumorales.

**Insights into the molecular mechanism of action of *Celastraceae*
sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human P-
glycoprotein**

Francisco Muñoz-Martínez^a, Carolina P. Reyes^b, Antonio L. Pérez-Lomas^a, Ignacio A. Jiménez^b, Francisco Gamarro^a and Santiago Castanys^{a,*}

^a*Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain*

^b*Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain*

***Corresponding author.** Tel.: +34 958 181666; fax: +34 958 181633; E-mail address: castanys@ipb.csic.es

Keywords: P-glycoprotein, dihydro- β -agarofurans, fluorescent derivative, fluorescent dye extrusion, binding site mapping.

Note: S. Castanys and F. Gamarro are equal senior investigators in this study.

SUMMARY

Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from *Celastraceae* have been recently shown to bind to human P-glycoprotein (Pgp), functioning as specific, mixed-type inhibitors of its drug transport activity, as well as multidrug resistance (MDR) modulators in vitro. However, nothing is known about whether such compounds are themselves transported by Pgp, if they affect Pgp expression as well as its activity, or the location of their binding site within the protein. We performed transport experiments with a newly synthesized fluorescent sesquiterpene derivative, which keeps the anti-Pgp activity of its natural precursor. This probe was poorly transported by Pgp, MRP1, MRP2 and BCRP transporters, comparing to classical MDR substrates. Moreover, Pgp did not confer cross-resistance to the most potent dihydro- β -agarofurans, which did not affect Pgp expression levels in several MDR cell lines. Finally, we have observed competitive and non-competitive interactions between one of such dihydro- β -agarofurans (Mama12) and classical Pgp modulators like cyclosporin A, verapamil, progesterone, vinblastine and GF120918. These findings suggest that multidrug ABC transporters do not confer resistance to dihydro- β -agarofurans and could not affect their absorption and biodistribution in the body. Moreover, we mapped their binding site(s) within Pgp, which could be of importance for the rational design of improved modulators based on dihydro- β -agarofurans' structure.

INTRODUCTION

A considerable number of cancers are either intrinsically resistant or exhibit treatment-induced acquired resistance, which complicates efforts for the successful treatment of cancer. Expression of P-glycoprotein MDR1 (Pgp) is among the best documented mechanisms of MDR (multidrug resistance) in human clinical cancers [1], and it has been detected in virtually all tumour types in man at both diagnosis and during relapse [2-4]. Moreover, expression of Pgp in many human cancers correlates with response to therapy and survival [5-7]. The use of Pgp modulators has been suggested as a way to overcome Pgp-mediated MDR [8] or even to prevent the emergence of MDR in cancer patients [9]. Many agents that modulate Pgp have been identified since the 1980s [10], but most of them showed disappointing results in vivo because they were themselves transported by Pgp, competing with the cytotoxic compounds for being effluxed by the pump. Therefore, they were too weak Pgp inhibitors and very high serum levels were necessary to produce effective MDR reversion in patients, resulting in unacceptable toxicity [11]. Moreover, many of these chemosensitizers lack specificity, inhibiting also other ABC transporters with well-defined physiological roles related to regulation of absorption, distribution and clearance of xenobiotics [12,13]. This leads to greater side effects of anticancer drugs and results in unpredictable pharmacokinetic interactions that preclude their clinical use. Therefore, a Pgp modulator with any pretension of clinical use must be effective enough to inhibit Pgp (must be itself non-transported), must be devoid of intrinsic toxicity, and highly specific for Pgp to avoid pharmacological interactions with the co-administered anticancer drugs [14].

In our previous work we demonstrated that dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from *Celastraceae* family of plants bind to transmembrane domains (TMDs) of human Pgp MDR1 (ABCB1), functioning as potent and specific mixed-competitive inhibitors of its drug transport activity, with insignificant inhibitory effects on the multidrug efflux pumps MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) and BCRP (ABCG2) [15]. However, it remained to be determined if these natural products are themselves transported by ABC multidrug efflux pumps, if they alter Pgp expression levels as well as its activity, and besides, we wanted to map their putative

binding site within the Pgp TMDs. For the former purpose, we have synthesized a new fluorescent sesquiterpene derivative, which keeps most of the MDR reversal activity of its natural precursor. By using such derivative in transport studies, we have demonstrated in situ that dihydro- β -agarofurans are either poor or not transport substrates for Pgp or any other ABC transporter known to be involved in cancer MDR. Furthermore, Pgp does not confer cross-resistance to the most potent natural sesquiterpenes isolated in our lab (Mama5, Mama12 and Machu4) [15], which supports the finding described above. In addition, these natural sesquiterpenes do not affect Pgp expression levels in a series of MDR cell lines. Finally, we measured the effects of individual Pgp modulators and pairs of modulators on the accumulation of daunorubicin (DNM) into NIH-3T3 MDR1 cells, and performed a simple kinetic analysis that enables such data to be modelled in terms of competitive, co-operative or non-competitive interaction between pairs of modulators. Mama12, one of the most potent Pgp sesquiterpene inhibitors described to date, seems to possess two different binding sites, of high and low affinity, and at least one of them appears to interact competitively with that of cyclosporin A and verapamil. Moreover, Mama12 does not bind to vinblastine-binding site(s), nor to progesterone-binding sites [both in TMDs and in nucleotide binding domains (NBDs)]. Finally, Mama12 cooperates in a synergistic manner with elacridar (GF120918) to bring about reversal of Pgp. The information about the way in which dihydro- β -agarofurans bind to Pgp and interact to other Pgp substrates and modulators could be of importance for the rational design of new, improved Pgp inhibitors based on the molecular structure of dihydro- β -agarofurans.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Vinblastine (VNB), G418, adriamycin, vincristine, verapamil, cyclosporin A (CsA), progesterone (PRG), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium], colchicine, *N*-methylisatoic anhydride (MIA), *N*-*N*-dimethylformamide (DMF), and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) were from Sigma-Aldrich. [³H]-azidopine (52 Ci/mmol) and NAMP100 amplifying solution for fluorography were from Amersham Biosciences. Calcein-

AM and Hoechst 33342 were from Molecular Probes. GF120918 was from GlaxoSmithKline. The C219 monoclonal antibody, directed against Pgp, was from Calbiochem. Daunorubicin (DNM) was from Pfizer. Natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from *Celastraceae* plants Mama5, Mama12 and Machu4 were isolated, purified and characterized as described previously [18]. The sesquiterpene [1α -acetoxy- 9α -benzoyloxy- 8β , 15 -di(2-methylbutyroyloxy)- 2α , 4β , 6β -trihydroxydihydro- β -agarofuran] from *Crossopetalum tonduzi* (sesquiterpene T3), described previously [19], was used for the synthesis of the 6β -methylantranoyl (MANT) fluorescent derivative (excitation/emission wavelength \sim 350/446 nm) (Fig. 1).

Synthesis of MANT-sesquiterpene. In order to synthesize a fluorescent dihydro- β -agarofuran derivative active as Pgp modulator, the following considerations were taken into account: firstly, the parental sesquiterpene should be itself active against Pgp and possess a free hydroxyl group at position C-6 to allow the acylation of the molecule with the chosen fluorescent probe. Secondly, the chosen fluorescent probe to be attached at C-6 should resemble in size and chemical nature to that of the typical groups that use to occur in the basic scaffold of active natural sesquiterpenes. For these reasons, sesquiterpene T3 and MIA were chosen as the parental molecule and the fluorescent probe precursor, respectively.

Attachment of the fluorescent group MANT (methylantranoyl) to the above mentioned natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpene T3 was achieved by regioselective acylation of the hydroxyl group at C- 6β with MIA. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 automatic polarimeter, and the $[\alpha]_D$ are given in 10^{-1} deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$. IR (film) spectra were recorded on a Bruker IFS 55 spectrophotometer. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer. Electron impact mass spectroscopy (EIMS) and high-resolution EIMS (HREIMS) were recorded on a Micromass Autospec spectrometer. Monitoring and purification of the reactions were performed using silica gel (TLC, plastic sheets, silica gel 60-250 UV_{250} , Panreac).

MIA, DMF and DMAP were used without further purification. A solution of sesquiterpene T3 (6.0 mg, 9.3×10^{-3} mmol), MIA (4 mg, 2.2×10^{-3} mmol) and DMAP (0.2 mg, 1.6×10^{-3} mmol) in dry DMF (1.0 ml) was stirred for 18 hours at room temperature. The reaction was quenched by the addition of ethanol (0.5 ml) followed by stirring for 30 minutes at room temperature. The mixture was evaporated with dryness, and the residue was purified by preparative TLC using n-hexane/ethyl acetate (1:1), yielded 2.6 mg (36%) of the desired MANT-sesquiterpene as a colourless lacquer, followed by 2.8 mg (47%) of the starting material: $[\alpha]_{D}^{20} = +40^{\circ}$ (c 0.16, CHCl_3); IR γ_{max} (film) 3525, 3385, 2960, 2925, 2854, 1732, 1681, 1580, 1368, 1263, 1239, 1154, 1094, 1031, 755, 712 cm^{-1} ; HNMR (CDCl_3) δ 0.58 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.95 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.33 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.38 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.71 (3H, s), 1.82 (2H, m), 2.08 (2H, m), 2.21 (1H, m), 2.71 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 2.77 (1H, m), 2.91 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 4.16 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 4.86, 5.06 (2H, d_{ab} , $J = 13.4$ Hz), 5.49 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 5.84 (1H, dd, $J = 3.4, 9.8$ Hz), 6.14 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.50 (1H, s), 6.63 (2H, m), 7.45 (3H, m), 7.57 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.70 (1H, d, $J = 5.6$ Hz), 7.94 (2H, dd, $J = 1.2, 8.3$ Hz), 8.18 (1H, dd, $J = 1.4, 7.9$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 11.1 (q), 11.7 (q), 16.1 (q), 16.8 (q), 21.0 (q), 24.7 (q), 25.8 (q), 26.2 (t), 26.6 (t), 29.5 (q), 31.9 (q), 41.1 (d), 41.6 (d), 44.3 (t), 51.7 (s), 52.1 (d), 62.1 (t), 67.5 (s), 69.9 (d), 73.8 (d), 75.6 (d), 84.0 (s), 78.1 (d), 92.2 (s), 109.5 (s), 110.7 (d), 114.9 (d), 128.6 (2x d), 129.6 (2x d, s), 132.7 (d), 133.4 (d), 135.0 (d), 152.0 (s), 165.9 (s), 167.2 (s), 169.7 (s), 175.2 (s), 176.3 (s); EIMS m/z (%) 781 (M^+ , 0.5), 691 (1.0), 675 (0.7), 663 (0.5), 569 (0.7), 394 (1), 369 (0.8), 322 (2.9), 283 (0.6), 250 (1.1), 221 (2.0), 191 (1.2), 136 (14.7), 109 (20.1), 81 (37.5), 57 (100); HREIMS m/z calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_1\text{O}_{13}$ 781.36734, found 781.36710.

Cell cultures. Mammalian cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , with their respective media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and 250 U/ml penicillin G plus 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulphate (Invitrogen), as well as the appropriate concentration of drugs indicated. The cell lines were: parental, drug-sensitive NIH-3T3 and its MDR counterpart transfected with human MDR1-

G185 (cultured in the presence of colchicine 60ng/ml) [20]; parental, drug-sensitive AuxB1 and the MDR colchicine-selected lines CH^RC5 (colchicine 10 µg/ml) [21], and CH^RB30 (colchicine 30 µg/ml) [22]; parental, drug-sensitive MDCKII cells and its MDR counterpart transfected with human MRP2 [23]; parental 2008 cells and its MDR counterpart transfected with human MRP1 [24]; parental MDA-MB-231 cells and its MDR counterpart transfected with human BCRP, MDA-MB-231 BCRP clone F12 (G418 400 µg/ml), obtained in our laboratory by subcloning of the original clone 23 [25] by the limit dilution method; parental, drug-sensitive L1210S cells and the MDR L1210R (DNM 1 µM) [26]; parental CCRF-CEM cells and the MDR sublines CCRF/ADR5000 (adriamycin 5 µg/ml) and CCRF/VCR1000 (vincristine 1µg/ml) [27].

Cytotoxicity assays with sesquiterpenes and its influence on Pgp expression

Intrinsic toxicity of sesquiterpenes in drug sensitive cells and their Pgp-expressing counterparts, as well as reversion of resistance to DNM and VNB, were determined by the MTT colorimetric assay in 96 well-plates as described [15]. Dose-response curves were generated by plotting percentage of cell growth against concentration of cytotoxic drug (DNM or VNB), and the data points (mean ± SD; P < 0.05) were fitted by non-linear regression to a four parameters logistic curve using SigmaPlot 2000 for Windows (SPSS Inc.) to determine IC₅₀ values and to calculate reversal indexes (ratio between IC₅₀ without and with modulator). The influence of sesquiterpenes Mama5, Mama12 and Machu4 on Pgp expression was determined by measuring the expression levels of the protein in CH^RC5, CH^RB30, L1210R, CCRF/ADR5000 and CCRF/VCR1000 cells after 72h incubation in the presence of 3 µM of each sesquiterpene. We check first that such concentration was able to sensitize MDR cells by 60-90%, depending on the cell line, with low intrinsic toxicity. After this incubation period, cells were harvested, washed once with ice-cold PBS, diluted in ice-cooled hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing a cocktail of protease inhibitors; Sigma-Aldrich) at a concentration of 1 × 10⁶ cell/ml, and disrupted by 50 strokes in a teflon-glass homogenizer, monitoring the disruption process under the microscope. Then,

the homogenates were centrifuged once at $500 \times g$ $4^{\circ}C$ to remove intact cells and nuclei, and the supernatant submitted to ultracentrifugation ($100000 \times g$ $4^{\circ}C$) to obtain the whole membrane and microsomal fraction. The protein concentration in each sample was measured by the method of Bradford, in order to process the same amount of total proteins of each sample and allow reliable comparison of Pgp expression among different samples. Proteins were resolved by SDS-PAGE on 9% gels and transferred to PVDF membranes (Millipore), to perform Western blot for immunodetection of Pgp using C219 monoclonal antibody.

MDR reversal and photoaffinity labeling assays with MANT-sesquiterpene

In order to check the anti-Pgp activity of the newly synthesized fluorescent sesquiterpene derivative, both parental sesquiterpene (T3) and MANT-sesquiterpene were studied in parallel as following: MTT assays were performed to test their respective abilities to reverse cellular resistance (as described above), as well as flow cytometry analysis to test the inhibition of Pgp-mediated DNM efflux in NIH-3T3 MDR1-G185 cells, as previously described [15]. Measurement of the fluorescence signal of individual cells due to DNM accumulation was performed with a Becton Dickinson FacScan. Moreover, in order to demonstrate that MANT-sesquiterpene binds to Pgp as natural sesquiterpenes do, a competition assay of the photoaffinity labeling of Pgp by 3H -azidopine was performed in the presence of a 100-fold molar excess of MANT-sesquiterpene, as described in [28], using CH^RB30 plasma membrane vesicles purchased from Dr. Frances J. Sharom's laboratory (Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada).

Accumulation and efflux experiments with MANT-sesquiterpene

Intracellular accumulation experiments with the MANT-sesquiterpene were performed by plating NIH-3T3 MDR1-G185, CH^RC5, 2008-MRP1, MDCKII-MRP2 or MDA-MB-231 BCRP clone F12 cells in 96-well plates (NUNC) at a density of $2-4 \times 10^4$ cells/well. The following day, when cells were forming a 90% confluent monolayer in all the wells of a plate, the old

medium was removed and Pgp-, MRP1-, MRP2- and BCRP-expressing cells were incubated at 37°C in the presence of 10 μ M MANT-sesquiterpene at increasing times ranging from 0 to 180 min in order to generate time-dependent accumulation curves. For comparison, similar curves were also generated for the different cell lines in the presence of Pgp substrate DNM 10 μ M (NIH-3T3 MDR1 and CH^RC5), 1 μ M calcein-AM (2008-MRP1 and MDCKII-MRP2) or 1 μ M Hoechst 33342 (MDA-MB-231 BCRP clone F12). After each incubation period, the monolayers were washed twice with cell culture medium plus 10% FBS in order to remove any extracellular trace of fluorescent MDR substrate or MANT-sesquiterpene. Finally, 50 μ M of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, SDS 0,2%) were added to each well and incubated overnight at 4°C in the dark. The accumulated intracellular fluorescence due to DNM ($\lambda_{\text{excitation}} = 480$ nm; $\lambda_{\text{emission}} = 590$ nm), calcein ($\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm; $\lambda_{\text{emission}} = 520$ nm), Hoechst 33342 or MANT-sesquiterpene ($\lambda_{\text{excitation}} = 350$ nm; $\lambda_{\text{emission}} = 446$ nm) was measured in a microplate spectrofluorometer "SpectraMax Gemini EM" (Molecular Devices) using SoftmaxPro 4.3 software (also from Molecular Devices).

Efflux experiments were performed as follows: cell monolayers in 96-well plates were incubated for 2h at 37°C in the presence of 10 μ M MANT-sesquiterpene or DNM in order to load cells with each fluorophore. Afterwards, the fluorophore-containing medium was removed, the monolayers were washed twice with cell culture medium plus 10% FBS, and 100 μ L of either normal medium plus 10% FBS (to measure the intracellular retained fluorescence only) or HPMI-glucose medium (to measure both intra and extracellular fluorescence), both without fluorophore, were added to wells and incubated for different times to allow the fluorophores to be effluxed out of cells. After different incubation periods ranging from 0 to 90 min, the samples containing normal medium plus 10% FBS were submitted to another washing before adding the lysis buffer, in order to remove extracellular fluorescence and to measure only the fluorescence remaining intracellular. On the other hand, lysis buffer were added directly to the samples containing HPMI-glucose medium without previous washing, and the entire fluorescence signal was measured, it means, the

sum of both the intracellular and the extracellular (effluxed). This control allowed us to rule out the possibility of a decrease of intracellular fluorescence due to metabolic degradation of the fluorescent probes, rather than active Pgp-mediated efflux from the cells. After lysis of cell monolayers, the fluorescence was measured as mentioned above and time-dependent efflux curves were generated with the resulting data points.

Fluorescence microscopy

Cells incubated with 1 μ M MANT-sesquiterpene for 2h at 37 °C were examined without previous fixation on a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope. Images were captured with a SPOT camera (Diagnostic Instruments) and analysed using Adobe Photoshop 5.5 software.

Mapping of dihydro- β -agarofurans binding site within TMDs of Pgp

We measured the effects of combinations of verapamil, VNB, CsA, GF120918 (elacridar), PRG and natural sesquiterpene Mama12, used in pairs, on the accumulation of DNM into NIH-3T3 MDR1 cells as described above: cells plated in 96-well plates were exposed to 10 μ M DNM in the absence/presence of modulators. When they were present, each modulator was used at increasing concentrations either alone, or in combination with different fixed concentration of a second modulator, in order to study how this second modulator affected the behaviour of the first modulator as blocker of Pgp-mediated DNM efflux. Data analysis to establish the relationships among pairs of modulators were performed as described by You-ming Shao and coworkers [29]. Briefly, the authors used a simple kinetic analysis consisting on plotting the data of DNM inhibition experiments and fitting such data points to hyperbolic curves described by the equation $D_i = [D_0 + (D_\infty - D_0)] \cdot C^h / K_i^h \cdot (D_\infty / D_0) + C^h$ (Equation 1), where D_i is the amount of intracellular fluorescence due to DNM accumulation into cells at any concentration of modulator C . D_0 is DNM accumulation in the absence of modulator, D_∞ the accumulation at an infinitely high modulator concentration, K_i is the *intrinsic* inhibition parameter of the reverser (i.e., the

concentration of modulator that produce 50% of DNM accumulation), and h is the Hill coefficient that determines the sigmoidicity of the curve.

The parallel equation (*Equation 2*) describes the effects of pairs of modulators in terms of the above variables and of the concentration of a second modulator B , which acts as a competitive modulator of the first one C . According to the classic competition model of the enzymologists, we have $D_i = [D_0 + (D_\infty - D_0)] \cdot C^h / K_i^h \cdot [(D_\infty / D_0) \cdot (1 + B)] + C^h$ (*Equation 2*). Therefore, the effect of a competitive second modulator is to increase the apparent K_i of the first modulator by the factor $(1 + B)$, where B is the concentration of the second modulator, divided by its intrinsic K_i . For the case of a synergistic second modulator, i.e., one that interacts non-competitively with the first modulator, the *equation 1* remains unchanged. Such non-competitive modulator will not affect the K_i of the first modulator. By fitting these equations to the data of D_i against C , at any value of B , using standard curve-fitting procedures, the appropriate values of K_i , D_0 and D_∞ can be found. From the dependence of this computed value of K_i (which refers to C) on the concentration of the second modulator B , one can test whether the interaction between the two modulators is additive (when K_i will increase with concentration of B) or synergistic (when K_i will remain unchanged). In the former case, one can find the appropriate value of K_i for the second reverser.

Furthermore, the drop in the Hill number, found in some cases as one increases the concentration of a second modulator, was used as a test for distinguishing between true synergism (between non-competitors) and the type of synergism displayed by two co-operating modulators, i.e., where the two different modulators can replace each other at the binding site of Pgp. To further support, where necessary (see interaction between PRG and Mama12), the above described analysis, we also determined the type of Pgp inhibition caused by pairs of modulators using the “Exploratory Enzyme Kinetics” application of SigmaPlot 2000 software for Windows, whose enzymological basis is the direct linear plot [30]. By determining the type of interaction between sesquiterpene Mama12 and other Pgp modulators, we could be able to map the sesquiterpene-binding site(s) of Pgp, and establish

if that binding site is exclusive of sesquiterpenes, or well shared by different modulators along with agarofurans.

RESULTS

MANT-sesquiterpene binds to and inhibits drug transport activity of Pgp

The fluorescent derivative MANT-sesquiterpene should keep the MDR reversal ability of its natural precursor if pretended to be a reliable probe for studying the mechanism of action of dihydro- β -agarofurans as Pgp inhibitors. Consequently, we studied the MDR reversal activity and the ability to block the Pgp-mediated DNM transport activity of both parental sesquiterpene and MANT-sesquiterpene in NIH-3T3 cells over-expressing human Pgp.

The ability of parental sesquiterpene (T3) (Fig.1) and MANT-sesquiterpene to reverse cellular MDR to DNM and VNB in NIH-3T3 MDR1 cells was tested by MTT-based cytotoxicity assays. IC₅₀ for DNM were 30.3 ± 11.3 and 383.0 ± 62.1 ng/ml in drug-sensitive and MDR cells, respectively (~12.8-fold resistance). On the other hand, IC₅₀ for VNB in drug-sensitive and MDR cells were, respectively, 1.3 ± 0.6 and 121.0 ± 24.3 ng/ml (~93-fold resistance). An important MDR reversion, comparable to that caused by classical modulator verapamil, was observed when adding sesquiterpene T3 to cell culture medium: when reversing resistance to DNM, 3 and 10 μ M T3 caused in MDR cells an IC₅₀ shift from its original value (383.0 ± 62.1 ng/ml) to 118.2 ± 24.1 and 19.8 ± 6.3 ng/ml, respectively (3.2- and 19.3-fold sensitization); on the other hand, when reversing VNB resistance, 3 and 10 μ M T3 shifted IC₅₀ from 121.0 ± 24.3 ng/ml to 22.2 ± 4.5 and 4.3 ± 2.2 ng/ml, respectively (5.5- and 28.1-fold sensitization).

Regarding to MANT-sesquiterpene, despite its chemical modification with respect to the parental molecule, it was also able to cause an important MDR reversion: at 3 and 10 μ M, it was able to produce, respectively, 3.6- and 10.4-fold sensitization to DNM, and 1.9- and 12.3-fold sensitization to VNB. This means that MANT-sesquiterpene retains a significant ability to reverse MDR, only slightly affected by the MANT group.

In flow cytometry experiments, the fluorescence excitation and emission spectra of MANT-sesquiterpene and DNM were different enough as to exist any fluorescence interference between the two fluorophores that could affect the results of Pgp-dependent DNM transport inhibition experiments. These results are shown in Fig.2A, demonstrating that MANT-sesquiterpene inhibits DNM extrusion by Pgp with quite a similar potency than parental sesquiterpene and the classical modulator verapamil, at 1 and 10 μ M.

Moreover, to confirm that MANT-sesquiterpene binds to Pgp as it was previously demonstrated for natural sesquiterpenes [15], we also performed competition assays of the photoaffinity labeling of Pgp by 3 H-azidopine in the presence of MANT-sesquiterpene. The result of such experiment is shown in Fig.2B, which suggests that MANT-sesquiterpene could bind to TMDs of Pgp. Taken together, these results seem to confirm that MANT-sesquiterpene is a fluorescent derivative reliable for studies of the mechanism of action of natural sesquiterpenes as Pgp modulators, since it keeps the activity and mode of action of its natural precursor.

Pgp does not confer cross-resistance to natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes because they are not transport substrates of the pump

Using the MTT-based colorimetric cytotoxicity assay, we determined the intrinsic toxicity of three natural sesquiterpenes (Mama5, Mama12 and Machu4) that were, among those isolated in our lab, the most potent compounds reversing Pgp-dependent MDR [15]. As shown in Fig.3, none of them was more toxic in drug-sensitive cells than in MDR cells, as it would be expected if Pgp conferred cross-resistance to them (i.e., if they were Pgp transport substrates). Strikingly, these natural sesquiterpenes were even slightly more toxic to Pgp-expressing cells than to drug-sensitive cells.

Once we demonstrated that Pgp does not confer cross-resistance to dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes, we were interested on demonstrating that such absence of cross-resistance was due to the fact that sesquiterpenes are either poorly or not transported at all by human Pgp. In order to address such question, we used MANT-sesquiterpene in

accumulation and efflux experiments in Pgp-expressing intact cells. In accumulation experiments, NIH-3T3 wild-type and MDR1 cells were incubated with either 10 μ M MANT-sesquiterpene or 10 μ M DNM (classical Pgp substrate) at increasing times in order to generate time-dependent accumulation curves. As expected (Fig. 4A), DNM greatly accumulates in NIH-3T3 wild-type cells but very few in MDR1 cells. However, MANT-sesquiterpene (Fig. 4B) accumulates quite similarly in both cell lines, regardless Pgp expression. In order to rule out the possibility of be overwhelming the ability of Pgp for extruding MANT-sesquiterpene, we repeated the same experiment but at ten-fold lower MANT-sesquiterpene concentration (1 μ M). In this case, only insignificant differences (plots not shown) of MANT-sesquiterpene accumulation were observed between Pgp-expressing and non-expressing cells, similarly to the results shown in Fig. 4A and 4B.

In efflux experiments, cells were incubated for 2 h with either 10 μ M DNM or 10 μ M MANT-sesquiterpene. According to the time-dependent accumulation curves described above, 2h was long enough time as to allow the fluorescent probes to reach the maximal accumulation level inside the cells. After this incubation step, the fluorophores-containing medium was removed, the cells washed, subsequently incubated in fluorophores-free medium, and the remaining intracellular fluorescence was measured at increasing times. The rate of DNM efflux was highly increased in those cells expressing Pgp at the plasma membrane (Fig. 4C), but the rate of MANT-sesquiterpene efflux was almost unaffected (Fig. 4D). In order to rule out the possibility of be measuring a fluorescence decrease due to intracellular quenching or metabolization of the probes, rather than active efflux, we performed parallel experiments as described above, but measuring the whole fluorescence (intracellular plus extracellular/effluxed) at increasing times, instead of only that remaining intracellular. We observed (data not shown) that both DNM and MANT-sesquiterpene were not quenched intracellular, but effluxed out of the cells either by active pumping (in the case of DNM) or by passive diffusion down the concentration gradient (in the case of MANT-sesquiterpene).

Finally, to assess that the previous results were not cell-specific but a general phenomenon resulting of sesquiterpene-Pgp interaction, we performed the same experiments in another Pgp-expressing cell line. We chose the line CH^RC5 due to its high Pgp expression levels (up to 5% of total plasma membrane proteins), which would allow us to determine beyond doubts whether MANT-sesquiterpene was or not transported by the drug efflux pump. The results shown in Fig.4E and 4F (DNM and MANT-sesquiterpene, respectively) seems to suggest that MANT-sesquiterpene, although far less than DNM, was actively pumped out by Pgp, since the probe accumulated about 20% less in CH^RC5 cells with respect to parental AuxB1 cells. In order to assure that such finding was not due to differences in the membrane permeability of MANT-sesquiterpene between parental AuxB1 line and its MDR counterpart, we also performed efflux experiments (Fig. 4G and 4H), which demonstrated that MANT-sesquiterpene was indeed actively effluxed from Pgp-expressing CH^RC5 cells, although very poorly and far less efficiently than classical Pgp substrate DNM.

Intracellular localization of MANT-sesquiterpene in NIH-3T3 cells by fluorescence microscopy

We have demonstrated that MANT-sesquiterpene was a very poor Pgp substrate, whose time-dependent intracellular accumulation was only affected by the drug efflux pump when such is highly over-expressed. In NIH-3T3 MDR1 cells, Pgp expression levels does not reach such high levels, which would explain that even at 1 μ M MANT-sesquiterpene, the time-dependent accumulation curves are essentially undistinguishable in both wild-type and MDR1 cells. However, it would be possible that, despite not being high enough as to affect the intracellular accumulation of MANT-sesquiterpene, Pgp levels in NIH-3T3 cells could be sufficient to affect the intracellular distribution pattern of the fluorescent probe. In order to prove that, we analyzed samples of both cell lines (Pgp expressing and non-expressing NIH-3T3 cells) by fluorescent microscopy after 2h incubation in the presence of 10 μ M MANT-sesquiterpene. The cells were not fixed after the incubation period to avoid any artifacts in the distribution pattern of intracellular fluorescence. We found no significant

differences in such pattern between both cell lines: MANT-sesquiterpene enters the cells through the plasma membrane by simple diffusion, and it spreads by the entire cytoplasm in a scattered distribution, concentrating mainly in the perinuclear region (possibly the endoplasmic reticulum vesicles) but without reaching inside the cell nucleus (not shown).

Effect of natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes on Pgp expression

Previously, we have demonstrated that natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes bind to TMDs of Pgp and inhibits its drug transport activity in a mixed-type fashion [15]. Moreover, we are reporting in the present work that the pump poorly transports a fluorescent sesquiterpene derivative and does not confer cross-resistance to natural dihydro- β -agarofurans. However, it remained to be determined whether these natural compounds, in addition to inhibit their activity, affect the expression levels of the protein. In order to answer such question, we used a series of murine, hamster and human MDR cells (L1210R, CH^RC5, CH^RB30, CCRF/ADR5000 and CCRF/VCR1000), which over-express Pgp as their major mechanism of multidrug resistance. Each Pgp-expressing cell line was incubated for 3 days in the presence of 3 μ M of each natural sesquiterpene (Mama5, Mama12 or Machu4). This concentration was selected for not causing greater than 10% growth inhibition on any of the above cell lines but, however, for being able to reverse resistance to DNM by 60-90% depending on the cell line. Fig.5 shows the comparative Pgp expression levels in each cell line with/without sesquiterpenes. The protein concentration of all the samples was accurately determined, and equal amounts of each sample were processed in order to allow reliable comparisons of Pgp levels. It was found no significant alteration of Pgp expression levels.

Duration of the reversal effect of natural sesquiterpenes in NIH-3T3 MDR1 cells

The time-dependent curve of MANT-sesquiterpene efflux from NIH-3T3 cells (Fig.4D) showed that the probe, at the initial stage of efflux, did leave the cells quite fast by simple diffusion down the concentration gradient; however, after 1 h, the efflux rate slowed down dramatically, and the intracellular concentration of the probe remained stable at levels 30-

40% of the original fluorescent signal, decreasing then only very slowly. This suggested that sesquiterpenes exist inside the cells in two forms, one that could be free in the cytoplasm and diffuses fast from the cells (initial stage of rapid efflux), and other form tightly bounded to its intracellular target(s), or sequestered inside vesicles (later stage of very slow efflux). It means that sesquiterpenes, until complete removal, might be for a considerable time inside the cells exerting their pharmacological action as Pgp inhibitors. In order to test such assumption, we incubated NIH-3T3 MDR1 cells with 10 μ M of Machu4 (the most potent sesquiterpene Pgp inhibitor) for 2 h, in order to load cells with the natural sesquiterpene. Afterwards, cells were washed and the ability of Pgp to actively extrude DNM was tested in DNM accumulation experiments at increasing times after washing the sesquiterpene from the cell culture medium. In such situation, only the amount of sesquiterpene remaining inside the cells could exert any measurable Pgp inhibition. As controls, the DNM-extruding activity of Pgp was also determined in the absence (100% Pgp activity) and in the continuous presence (complete inhibition of Pgp activity) of 10 μ M Machu4. Fig.6 shows the time-dependent DNM accumulation curves in the continuous presence, absence, and after removal of Machu4 from the cell culture medium. It is clear that, after washing, the sesquiterpene is still able to block for a considerable time the Pgp-dependent DNM extrusion. Plotting the DNM accumulation level at a fixed time (20 min.) against the time after Machu4 removal from the extracellular medium (plot not shown), the half-life of Machu4 activity inside the cells was estimated in around 30 h.

Ability of MRP1, MRP2 and BCRP to transport MANT-sesquiterpene

In order to explore the putative role of other human MDR efflux pumps as potential transporters of dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes, the same MANT-sesquiterpene accumulation experiments performed in Pgp-expressing cells were also done in cells over-expressing human MRP1, MRP2 or BCRP multidrug efflux pumps. MANT-sesquiterpene was also used at 10 μ M, similarly to experiments in Pgp-expressing cells, and a well-known fluorescent substrate for MRP1, MRP2 and BCRP was tested in parallel at a relevant

concentration for comparison to MANT-sesquiterpene. The results of such set of experiments are shown in Fig.7. The probe calcein-AM was actively effluxed by both MRP1 and MRP2 pumps (Fig. 7A and 7C), but MANT-sesquiterpene was not (Fig. 7B and 7D). Similarly, Hoechst 33342 was effluxed as expected for a BCRP substrate (Fig. 7E), but MANT-sesquiterpene was not (Fig. 7F). Therefore, these results suggest that none of the major human multidrug ABC transporters play a significant role in the active transport of natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes.

Synergistic and co-operative interactions between natural sesquiterpenes and classical modulators to bring about Pgp inhibition

Table 1 shows, in one side, the effects (observed as K_i and Hill number variations) of fixed Mama12 concentrations (ranging from 0 to 1-2 μ M) on the Pgp inhibition caused by increasing concentrations of five different classical Pgp modulators (verapamil, VNB, CsA, GF120918 and PRG). On the other side of the table is shown, conversely, the effect of increasing fixed concentration of the five classical modulators mentioned earlier on K_i and Hill number of sesquiterpene Mama12 as blocker of Pgp-dependent DNM efflux in intact cells. The values of Hill number and K_i for Pgp-mediated DNM transport inhibition were computed from curves fitted to the experimental data points accordingly to *Equations 1* or *2* (see "Materials and Methods"), depending on the case. Such values are expressed as means \pm S.E. ($P < 0.001$) of two different experiments for each pair of modulators, performed by triplicate.

The intrinsic K_i of verapamil slightly goes down with increasing Mama12 concentrations, rendering the Hill number unaffected. However, K_i of Mama12 increases in the presence of increasing verapamil concentrations, and its Hill number decreases. An explanation to account for this finding is that Mama12 could have 2 different binding sites within Pgp of high and low affinity, respectively, that are not coupled allosterically, since Hill number for Mama12-mediated inhibition of Pgp transport activity is not much higher than 1. Binding of Mama12 to its high affinity-binding site would decrease verapamil K_i (non-competitive

interaction), but Mama12 low affinity-binding site and verapamil-binding site could interact physically (competitively), causing Mama12 Hill number to drop and its intrinsic K_i to increase. This notion of the existence of two different sesquiterpene binding sites within Pgp is further supported by the fact that sesquiterpenes modulate Pgp ATPase activity in a biphasic way, stimulating ATPase at concentrations lower than 1 μM and then inhibiting it at higher concentrations [15].

In turn, Mama12 competitively interacts to CsA, since both modulators increase one another their respective K_i . However, Mama12 Hill number, as opposed to in the presence of verapamil, remains unaffected by CsA. This suggests that CsA and verapamil, although interacting competitively between them and also competitively with respect to Mama12, do not interact to Mama12 exactly in the same way. It could be possible that CsA, given its huge molecular volume, overlap with both high- and low-affinity Mama12-binding sites and affect them indistinctively, but verapamil is able only to overlap with one of both binding sites, presumably the low-affinity one.

Mama12 and VNB seem to interact synergistically (non-competitively), collaborating one another to bring about Pgp inhibition, since they mutually cause a decrease in their respective K_i values without affecting significantly their respective Hill numbers. In the same way, Mama12 and GF120918 also interact in a synergistic manner, mutually boosting their effects as Pgp-mediated DNM transport inhibitors.

Regarding to the pair of modulators PRG and Mama12, when PRG acts as the second modulator, two different effects on Mama12 kinetic parameters can be distinguished: at PRG concentrations lower than 10 μM , Mama12 K_i increases and Hill number remains constant, but at higher PRG concentrations (up to 30 μM), Mama12 K_i decreases and Hill number increases. This would suggest the existence of two different PRG-binding sites of high and low affinity, each one interacting to Mama12 binding in a different manner: In one hand, a competitive interaction would take place between the high affinity PRG-binding site and Mama12-binding site(s) and, in the other hand, a non-competitive interaction between

Mama12-binding site(s) and the low affinity PRG-binding site. However, much care should be taken when interpreting these results, since PRG is quite an unusual Pgp modulator. It is known that PRG possesses indeed two different binding sites within Pgp, one of high affinity located at the TMDs (affinity constant lower than 10 μM , as shown in [31]), and another of lower affinity located at the NBDs, with an affinity constant around 18-53 μM , depending on the tested steroid [32]. PRG at high concentrations inhibits Pgp drug transport activity, but at concentrations lower than around 10 μM , it has the unusual property among Pgp modulators of being able to stimulate the Pgp-mediated transport of those substrates that binds to either H site (for Hoechst 33342 and colchicine) or to R site (for rhodamine 123 and anthracyclines) within the TMDs in a positive allosteric manner [33]. DNM is an anthracycline and, hence, it is expected to bind to R site, and its transport to be stimulated accordingly by PRG. We have indeed observed such DNM transport stimulation by PRG (not shown), but at concentrations higher than 10 μM such stimulatory effect of PRG disappeared, and only its inhibitory effect was still observed. The presence of Mama12 up to 1 μM was unable to preclude this phenomenon of DNM transport stimulation by PRG. This suggests that both PRG- and Mama12-binding sites within TMDs are not overlapping physically, and that the apparent increase of Mama12 K_i caused by PRG up to 10 μM (as it is shown in Table 1) is the consequence of the DNM transport stimulation caused by PRG in this concentration range, rather than a competitive interaction between PRG and Mama12. It was performed a more detailed kinetic analysis of the combination of PRG up to 10 μM (stimulating concentration range) with different fixed concentrations of Mama12, by using the "Exploratory Enzyme Kinetics" application of SigmaPlot 2000 software for Windows. It revealed, indeed, a mixed-type interaction between both modulators, which argues against physical interactions between their respective binding sites within TMDs. On the other hand, the observed drop in Mama12 K_i caused by PRG concentrations higher than 10 μM , should be due to the fact that the binding of PRG to its low affinity-binding site at the NBDs causes a conformational change, as previously described [32]. Such change should then transmit to

TMDs and modify the Mama12-binding site(s) in a sense that increase their affinity for Mama12 and also the Hill number to values significantly equal to 2, coupling both sites allosterically to bring about Pgp inhibition.

In turn, fixed Mama12 concentrations, when combined with increasing PRG concentrations over 10 μ M (inhibitory range), induces a decrease in PRG K_i without affecting its Hill number, suggesting non-competitive interactions as it was also suggested above. Mama12-binding site(s) should not overlap with PRG-binding site within NBDs, since dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes do not interact physically to that Pgp domain [15], which further supports the result discussed earlier. Mama12 binding to TMDs produces a conformational change in Pgp that, despite not very important in magnitude (as shown in [15]), should transmit to the NBDs and make the steroids-binding site to increase its affinity for PRG.

DISCUSSION

In our previous work [15], we demonstrated that natural dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from *Celastraceae* were able to reverse potently cellular MDR by blocking specifically human Pgp as mixed-type inhibitors of its drug transport activity. Moreover, we also showed that such natural compounds did not affect the activity of MRP1, MRP2 and BCRP, which claimed in favour of their specificity of action. In the present work, by using a newly synthesized sesquiterpene fluorescent derivative (MANT-sesquiterpene) that holds the anti-Pgp activity of its natural precursor, we have proceed to further characterize the molecular mechanism of action of dihydro- β -agarofuran as Pgp-inhibitors, supporting the findings of our previous work. We have demonstrated, first of all, that Pgp does not confer cross-resistance to natural sesquiterpenes and, secondly, that this multidrug efflux pump, comparing to classical Pgp substrates like DNM, almost insignificantly transports MANT-sesquiterpene. In fact, such net transport mediated by Pgp across the plasma membrane is only apparent in cells that highly over-express the transporter, and only when the efflux of

the probe, rather than its accumulation, is measured. This new finding, firstly, supports our previous finding that shown dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as potent Pgp inhibitors, since it is well-known that good Pgp substrates use to be poor inhibitors and vice versa [34]. And secondly, it makes unlikely that Pgp contributes significantly to sesquiterpenes transport in vivo, since no tissue or tumour has been shown to over-express Pgp up to the levels (5% of total membrane proteins) necessary to observe any signal of net Pgp-mediated sesquiterpene transport. Moreover, neither MRP1/MRP2 nor BCRP efflux pumps are able to transport MANT-sesquiterpene across the plasma membrane. Therefore, none of the ABC multidrug efflux pumps implicated in cancer MDR could be considered as a resistance factor against natural sesquiterpenes and, presumably, they would be also unable to affect their intestinal absorption and biodistribution. That is an additional requirement, along with potency and specificity of action, which any ideal MDR modulator should satisfy.

We have also observed that the intracellular distribution of MANT-sesquiterpene is not only restricted to the plasma membrane (the final destination of functional Pgp in the majority of cells), but the probe is also able to get inside the cells and spread intracellular, giving a scattered pattern of intracellular fluorescence that concentrates mainly on the perinuclear region of the cytoplasm. This suggests that the probe accumulates in membrane vesicles of Golgi and endoplasmic reticulum (ER), and that natural sesquiterpenes inhibit potentially the activity not only of Pgp at the plasma membrane, but also the newly synthesized pump, at ER level and vesicles of the secretory pathway, in all its way towards the plasma membrane. The fact that sesquiterpenes do not seem to be inactivated by intracellular metabolism (not shown), and the long half-life of its intracellular activity (up to 30 h) further supports its potential ability to inhibit efficiently Pgp for a long time both at plasma membrane and in intracellular compartments. The reversal efficiency and duration of the anti-Pgp activity of sesquiterpenes within cells would be of great importance for the clinical reversion of MDR in tumours. This is due to the fact that inhibition of Pgp activity in 100% of Pgp-expressing cells would avoid the risk of selecting MDR clones that would expand and

repopulate those tumours that were initially responsive to chemotherapy. Moreover, it has been observed that Pgp, along with its drug transport-related role in MDR, also seems to exert anti-apoptotic activities due to its ability to modulate ceramide-mediated apoptosis. It is supposed that Pgp is able to do so by translocating both sphingomyelin from the inner to the outer leaflet of plasma membrane [35,36], and glucosyl-ceramide [37] from the cytoplasm to the Golgi lumen in human breast cancer cells [38] and acute myeloid leukemia cells [39]. Moreover, it has also been shown that Pgp inhibits FAS-induced caspase-8 activation in an ATP hydrolysis-dependent fashion. Therefore, the potential clinical use of sesquiterpenes as inhibitors of Pgp activity would not only consist of reversing classical MDR, but also of restoring sensitivity to FAS- and ceramide-dependent apoptosis in those malignancies in which Pgp plays a well-defined anti-apoptotic role.

We have also shown, by using a battery of Pgp-overexpressing cells, that none of the most potent natural sesquiterpenes is able to alter Pgp expression levels in long-term incubations. The over-expression of Pgp in cancer cells exposed to chemotherapeutics is a typical response of cells to stress signals [40]. Since stress is able to trigger many cellular responses simultaneously, it has been suggested that Pgp over-expression is only a part of a concerted, more global stress-induced response for cell survival, orchestrated by orphan nuclear receptors [41, 42]. The fact that natural sesquiterpenes inhibits Pgp activity but do not induce its expression would suggest, first, that they may not interfere with the *mdr1* transcription, translation or protein folding process and, second, that they may not interact with orphan nuclear receptors. The latter assumption is of particular importance, since this presumed property, if true, would mean that natural sesquiterpenes behave as “clean” MDR reversers that would not trigger global protective responses in cancers, like those involving changes on the expression of other stress proteins also involved in MDR along with Pgp (glutathion-S-transferase, cytochrome P450 enzymes, DNA-reparing enzymes, etc.).

Finally, the kinetic analysis of the interactions between the natural sesquiterpene Mama12 and classical Pgp modulators to inhibit Pgp-dependent DNM transport confirmed the TMDs of the pump as the location for dihydro- β -agarofurans binding site(s) within the

protein. In addition, such analysis also allowed us to find examples of both competitive and non-competitive interactions between Mama12 and classical modulators, which were consistent with previous information about the way in which classical modulators interact to each other in pairs to produce inhibition of Pgp. In brief, Mama12 possesses two binding sites within TMDs of high and low affinity, and at least one of them overlaps with verapamil and CsA binding sites, presumably sharing with them the so-called “*pharmacophore 1*” described in [43]. Moreover, Mama12 interacts non-competitively to both VNB (which occupy the so-called “*pharmacophore 2*”) and the PRG high and low affinity binding-sites. The fact that Mama12 does not compete with VNB, which is supposed to bind to the Pgp H and R sites for drug transport [33], is in agreement to our previous results [15] that showed Mama12 as a mixed-type inhibitor of Pgp-mediated tetramethylrosamine transport (a dye known to bind to the R site). Finally, Mama12 interacts synergistically with GF120918 (elacridar), mutually increasing their respective potencies to bring about Pgp inhibition.

In summary, all these findings suggest dihydro- β -agarofurans as a promising new family of Pgp inhibitors that could be safely and usefully used in clinical practice. Moreover, its privileged scaffold would allow the rational design of new structures even more potent and specific for Pgp. All the information that we have obtained about the molecular mechanism of action of dihydro- β -agarofurans will help us on such rational design and, in fact, future work in our laboratories will focus on that task using QSAR-based approaches.

ACKNOWLEDGMENT

We thank to Dr. Ira Pastan (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA) for providing the NIH-3T3 and NIH-3T3 MDR-G185 cell lines; Dr. Piet Borst (Division of Molecular Biology, The Netherlands Cancer Institute; Amsterdam, The Netherlands) for providing the 2008, 2008-MRP1 clone 8, MDCKII and MDCKII-MRP2 clone 17 cell lines; Dr. Douglass D. Ross (University of Maryland Greenbaum Cancer Centre, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA) for providing the MDA-MB-231 and MDA-MB-231-BCRP clone 23 cell lines; Dr. José A. Ferragut (Centro de Biología Molecular y

Celular, Universidad Miguel Hernandez, Elche, Spain) for providing the L1210 and L1210R cell lines; Dr. Johan Hofmann (Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria) for providing the CCRF-CEM, CCRF/ADR5000 and CCRF/VCR1000 cell lines; and Dr. Frances J. Sharom (Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada) for providing the AuxB1, CH^RC5 and CH^RB30 cell lines. Finally, we acknowledge Pfizer (Madrid, Spain) for providing the daunomycin used in this work, and GlaxoSmithKline (Madrid, Spain) for the GF120918. This work was supported by the Spanish Grants SAF-2003-04200-CO2-01 (to Francisco Gamarro) and BQU2003-09558-CO2-01 (to Ignacio A. Jiménez). Francisco Muñoz-Martínez is the recipient of a research fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (F.P.U. AP2000-0264), and Antonio L. Pérez-Lomas is the recipient of a research fellowship from Fundación Ramón Areces.

REFERENCES

- [1] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 48-58.
- [2] T.M. Grogan, C.M. Spier, S.E. Salmon, M. Matzner, J. Rybski, R.S. Weinstein, R.J. Scheper, W.S. Dalton, P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy, *Blood* 81 (1993) 490-495.
- [3] K. Han, J. Kahng, M. Kim, J. Lim, Y. Kim, B. Cho, H.K. Kim, W.S. Min, C.C. Kim, K.Y. Lee, B.K. Kim, C.S. Kang, Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia, *Acta Haematol.* 104 (2000) 174-180.
- [4] E. Mechetner, A. Kyshtoobayeva, S. Zonis, H. Kim, R. Stroup, R. Garcia, R.J. Parker, J.P. Fruehauf, Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 389-398.
- [5] G. Bradley, V. Ling, P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression, *Cancer Metastasis Rev.* 13 (1994) 223-233.
- [6] C.P. Leith, K.J. Kopecky, I.M. Chen, L. Eijdem, M.L. Slovak, T.S. McConnell, D.R. Head, J. Weick, M.R. Grever, F.R. Appelbaum, C.L. Willman, Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-

- glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study, *Blood* 94 (1999) 1086-1099.
- [7] D.M. van der Kolk, E.G. de Vries, W.J. van Putten, L.F. Verdonck, G.J. Ossenkoppele, G.E. Verhoef, E. Vellenga, P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia, *Clin Cancer Res.* 6 (2000) 3205-3214.
- [8] L. van Zuylen, K. Nooter, A. Sparreboom, J. Verweij, Development of multidrug-resistance convertors: sense or nonsense?, *Invest. New Drugs* 18 (2000) 205-220.
- [9] L. Beketic-Oreskovic, G.E. Duran, G. Chen, C. Dumontet, B.I. Sikic, Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1593-1602.
- [10] H. Thomas, H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein, *Cancer Control* 10 (2003) 159-165.
- [11] R. Krishna, L.D. Mayer, Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 265-283.
- [12] L.M. Chan, S. Lowes, B.H. Hirst, The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 25-51.
- [13] A.H. Schinkel, J.W. Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55 (2003) 3-29.
- [14] A.H. Dantzig, D.P. de Alwis, M. Burgess, Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55 (2003) 133-150.
- [15] F. Muñoz-Martinez, P. Lu, F. Cortes-Selva, J.M. Perez-Victoria, I.A. Jimenez, A.G. Ravelo, F.J. Sharom, F. Gamarro, S. Castanys, Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance, *Cancer Res.* 64 (2004) 7130-7138.
- [16] T.W. Loo, D.M. Clarke, Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36877-36880.
- [17] T.W. Loo, D.M. Clarke, Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 44332-44338.
- [18] M.L. Kennedy, F. Cortes-Selva, J.M. Perez-Victoria, I.A. Jimenez, A.G. Gonzalez, O.M. Munoz, F. Gamarro, S. Castanys, A.G. Ravelo, Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4668-4676.

- [19] B.M. Tincusi, I.A. Jimenez, A.G. Ravelo, R. Missico, New sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii*, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1520-1523.
- [20] C.O. Cardarelli, I. Aksentijevich, I. Pastan, M.M. Gottesman, Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters, *Cancer Res.* 55 (1995) 1086-1091.
- [21] V. Ling, L.H. Thompson, Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine, *J. Cell. Physiol.* 83 (1974) 103-116.
- [22] N. Kartner, D. Evernden-Porelle, G. Bradley, V. Ling, Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies, *Nature* 316 (1985) 820-823.
- [23] R. Evers, M. Kool, L. van Deemter, H. Janssen, J. Calafat, L.C. Oomen, C.C. Paulusma, R.P. Oude Elferink, F. Baas, A.H. Schinkel, P. Borst, Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1310-1319.
- [24] M. Kool, M. van der Linden, M. de Haas, G.L. Scheffer, J.M. de Vree, A.J. Smith, G. Jansen, G.J. Peters, N. Ponne, R.J. Scheper, R.P. Elferink, F. Baas, P. Borst, MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 6914-6919.
- [25] C. Erlichman, S.A. Boerner, C.G. Hallgren, R. Spieker, X.Y. Wang, C.D. James, G.L. Scheffer, M. Maliepaard, D.D. Ross, K.C. Bible, S.H. Kaufmann, The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux, *Cancer Res.* 61 (2001) 739-748.
- [26] M.D. Castro-Galache, J.A. Ferragut, V.M. Barbera, E. Martin-Orozco, J.M. Gonzalez-Ros, P. Garcia-Morales, M. Saceda, Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors, *Int. J. Cancer* 104 (2003) 579-586.
- [27] A. Kimmig, V. Gekeler, M. Neumann, G. Frese, R. Handgretinger, G. Kardos, H. Diddens, D. Niethammer, Susceptibility of multidrug-resistant human leukemia cell lines to human interleukin 2-activated killer cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 6793-6799.
- [28] A.R. Safa, C.J. Glover, J.L. Sewell, M.B. Meyers, J.L. Biedler, R.L. Felsted, Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 7884-7888.
- [29] Y.M. Shao, S. Ayes, W.D. Stein, Mutually co-operative interactions between modulators of P-glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1360 (1997) 30-38.
- [30] R. Eisenthal, A. Cornish-Bowden, The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, *Biochem. J.* 139 (1974) 715-720.

- [31] A.B. Shapiro, K. Fox, P. Lam, V. Ling, Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 841-850.
- [32] G. Dayan, J.M. Jault, H. Baubichon-Cortay, L.G. Baggetto, J.M. Renoir, E.E. Baulieu, P. Gros, A. Di Pietro, Binding of steroid modulators to recombinant cytosolic domain from mouse P-glycoprotein in close proximity to the ATP site, *Biochemistry* 36 (1997) 15208-15215.
- [33] A.B. Shapiro, V. Ling, Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities, *Eur. J. Biochem.* 250 (1997) 130-137.
- [34] S. Scala, N. Akhmed, U.S. Rao, K. Paull, L.B. Lan, B. Dickstein, J.S. Lee, G.H. Elgemeie, W.D. Stein, S.E. Bates, P-glycoprotein substrates and antagonists cluster into two distinct groups, *Mol. Pharmacol.* 51 (1997) 1024-1033.
- [35] A. van Helvoort, A.J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A.H. Schinkel, P. Borst, G. van Meer, MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine, *Cell* 87 (1996) 507-517.
- [36] C. Bezombes, N. Maestre, G. Laurent, T. Levade, A. Bettaieb, J.P. Jaffrezou, Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833, *Faseb J.* 12 (1998) 101-109.
- [37] P.D. Eckford, F.J. Sharom, The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids, *Biochem. J.* 389 (2005) 517-526.
- [38] J.A. Shabbits, L.D. Mayer, P-glycoprotein modulates ceramide-mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin-binding anticancer drugs, *Mol. Cancer. Ther.* 1 (2002) 205-213.
- [39] J. Turzanski, M. Grundy, S. Shang, N. Russell, M. Pallis, P-glycoprotein is implicated in the inhibition of ceramide-induced apoptosis in TF-1 acute myeloid leukemia cells by modulation of the glucosylceramide synthase pathway, *Exp. Hematol.* 33 (2005) 62-72.
- [40] M. Sukhai, M. Piquette-Miller, Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2000) 268-280.
- [41] T.W. Synold, I. Dussault, B.M. Forman, The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux, *Nat. Med.* 7 (2001) 584-590.
- [42] H. Wang, E.L. LeCluyse, Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 1331-1357.

- [43] A. Garrigues, N. Loiseau, M. Delaforge, J. Ferte, M. Garrigos, F. Andre, S. Orlowski, Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1288-1298.

Figure 1. Synthesis of the fluorescent derivative MANT-sesquiterpene. The synthesis was achieved by regioselective acylation with MIA of the hydroxyl group at C-6 β of the natural sesquiterpene 1 α -acetoxy-9 α -benzoyloxy-8 β ,15-di(2-methylbutyroyloxy)-2 α ,4 β ,6 β -trihydroxydihydro- β -agarofuran (*T3*).

Figure 2. MANT-sesquiterpene binds to and inhibits Pgp. The anti-Pgp activity of the fluorescent derivative and its natural precursor was established by modulation of DNM accumulation in NIH-3T3 MDR1, monitored by flow cytometry (A). Verapamil was used as positive control of Pgp inhibition for comparison. Results are the mean of two independent experiments, each measurement performed by triplicate. In (B) it is shown the displacement of ³H-azidopine binding to Pgp drug binding-site, as determined by photoaffinity labeling competition experiments. The result is representative of two independent experiments. Up: fluorography; low: immunodetection of Pgp by Western blot using C-219 anti-Pgp monoclonal antibody.

Figure 3. Cross-resistance to sesquiterpenes due to Pgp expression. Cytotoxicity assays were performed to test the intrinsic toxicity of the three most potent sesquiterpene inhibitors of Pgp available in our laboratory (Mama5, Mama12 and Machu4) against drug-sensitive and NIH-3T3 MDR1 cells. The plots show representative experiments of three different ones, performed each by triplicate.

Figure 4. MANT-sesquiterpene accumulation and efflux experiments in Pgp overexpressing cells. NIH-3T3 drug-sensitive and NIH-3T3 MDR1 cells, as well as AuxB1 and CH^RC5 cells, were incubated with either MANT-sesquiterpene or DNM (10 μ M), and the accumulated intracellular fluorescence measured at increasing times. In parallel experiments, the same cell lines were allowed to accumulate each fluorescent probe during 2h, then washed and further incubated in probe-free medium; the remaining intracellular

fluorescence at increasing times after washing was then measured (efflux experiments). The right column of plots represents experiments performed using MANT-sesquiterpene as a probe for Pgp-mediated transport, and the left one shows those experiments using for comparison DNM as classical Pgp substrate. Accumulation (A, B, E and F) and efflux experiments (C, D, G and H) were done using NIH-3T3 MDR1 cells (A, B, C and D) and CH^RC5 cells (E, F, G and H). Each plot is a representative experiment of two different ones, each performed by triplicate.

Figure 5. Influence of sesquiterpenes on Pgp expression. Pgp expression levels in different MDR cell lines were determined by Western blot and subsequent immunodetection of the multidrug transporter after 3 days incubation of each cell line with a subtoxic concentration (3 μ M) of the three most potent anti-Pgp sesquiterpenes described in our laboratory. After such incubation period, cells were homogenated and the whole membrane fraction was recovered. The protein concentration was accurately determined in each sample, and equal amounts of membrane proteins were resolved in SDS-PAGE and processed as described in *Material & Methods*.

Figure 6. Duration of the reversal effect of sesquiterpenes. NIH-3T3 MDR1 cells were incubated with sesquiterpene Machu4 10 μ M for 2 h, and then the cells were washed to eliminate any trace of extracellular sesquiterpene. Then, the ability of the intracellularly accumulated Machu4 to block Pgp drug transport activity was estimated by measuring the time-dependent accumulation of DNM (10 μ M) in the continuous presence/absence of Machu4, or at different times after washing. The plot shows a representative experiment of two independent DNM accumulation experiments performed each by triplicate.

Figure 7. Ability of MRP1, MRP2 and BCRP multidrug transporters to efflux MANT-sesquiterpene. Cell lines overexpressing the human multidrug transporters MRP1 (B),

MRP2 (D) and BCRP (F), and their drug-sensitive parental counterparts, were incubated with 10 μ M MANT-sesquiterpene. The accumulated fluorescence was measured at increasing times. 1 μ M calcein-AM for MRP1 (A) and MRP2 (C), or 1 μ M Hoechst 33342 for BCRP (E), were used as control probes for measuring drug transport mediated by each of these multi-drug transporters.

Figure 1

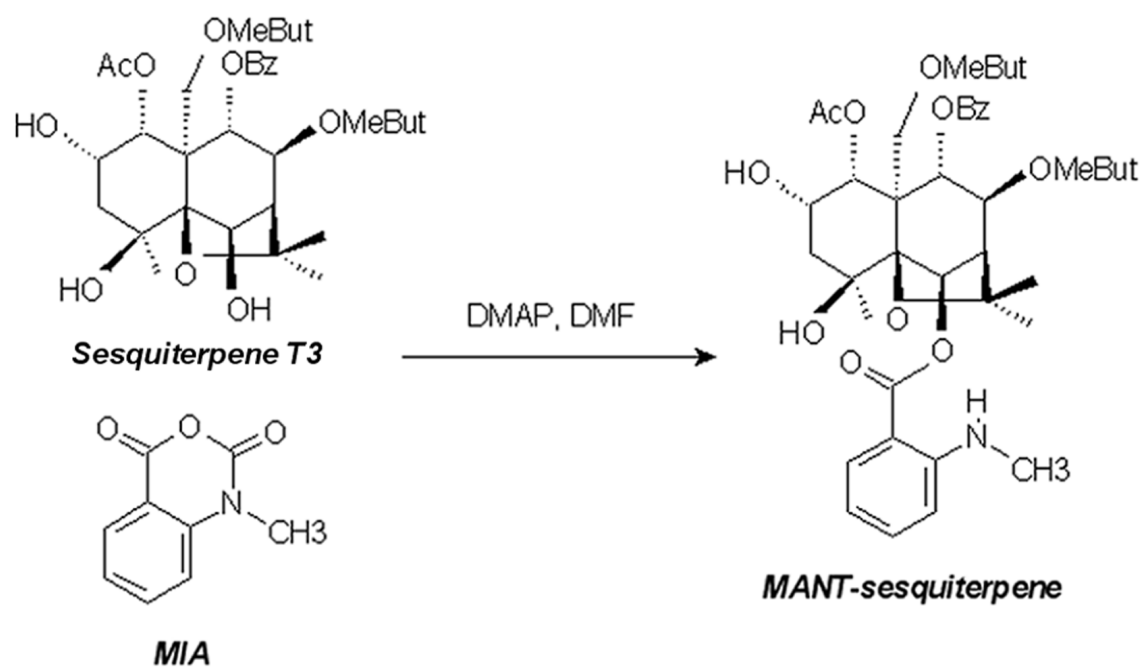


Figure 2

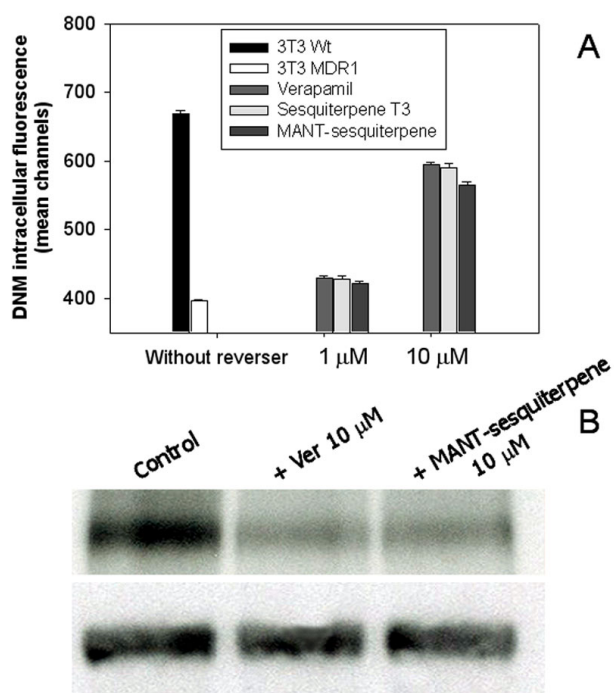


Figure 3

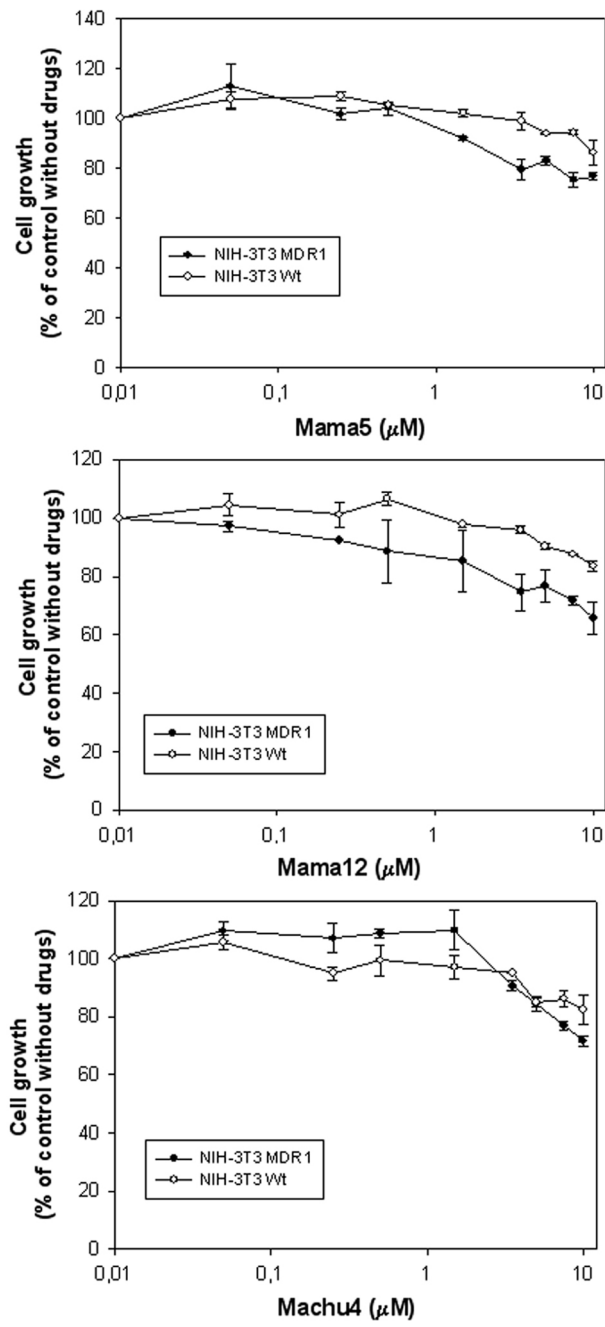


Figure 4

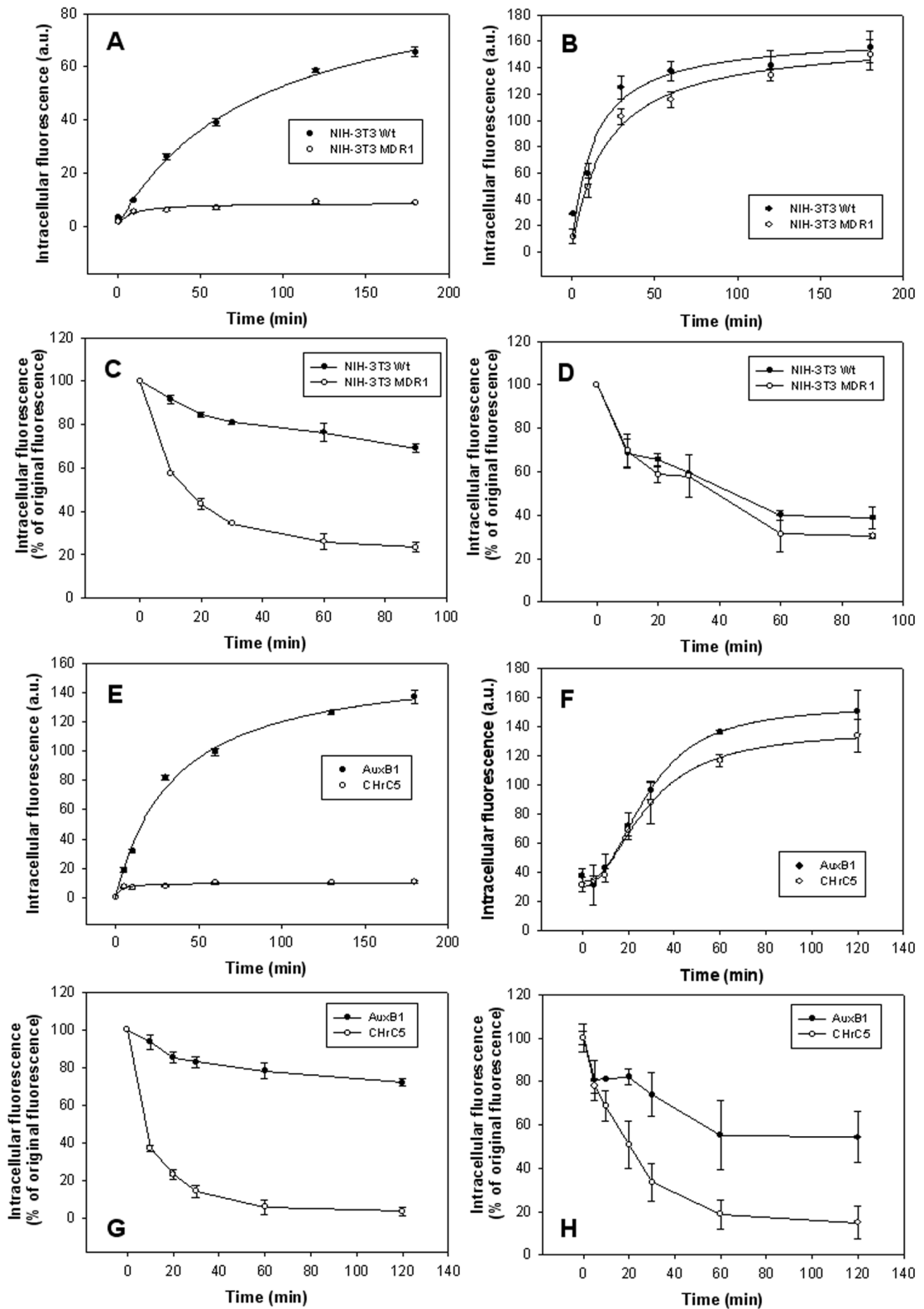


Figure 5

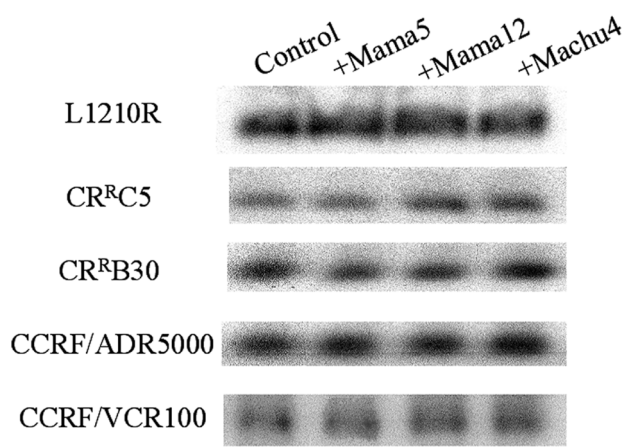


Figure 6

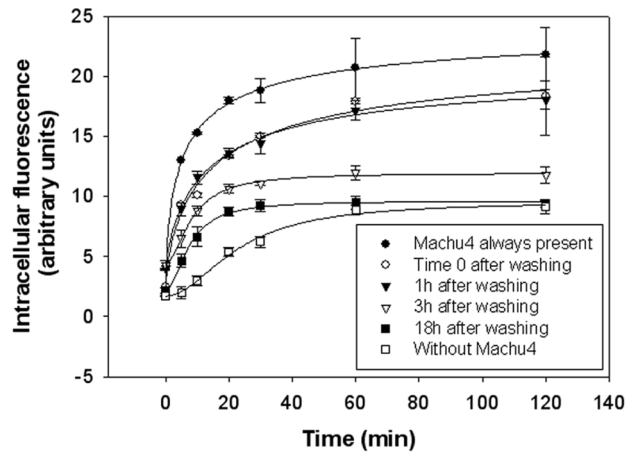


Figure 7

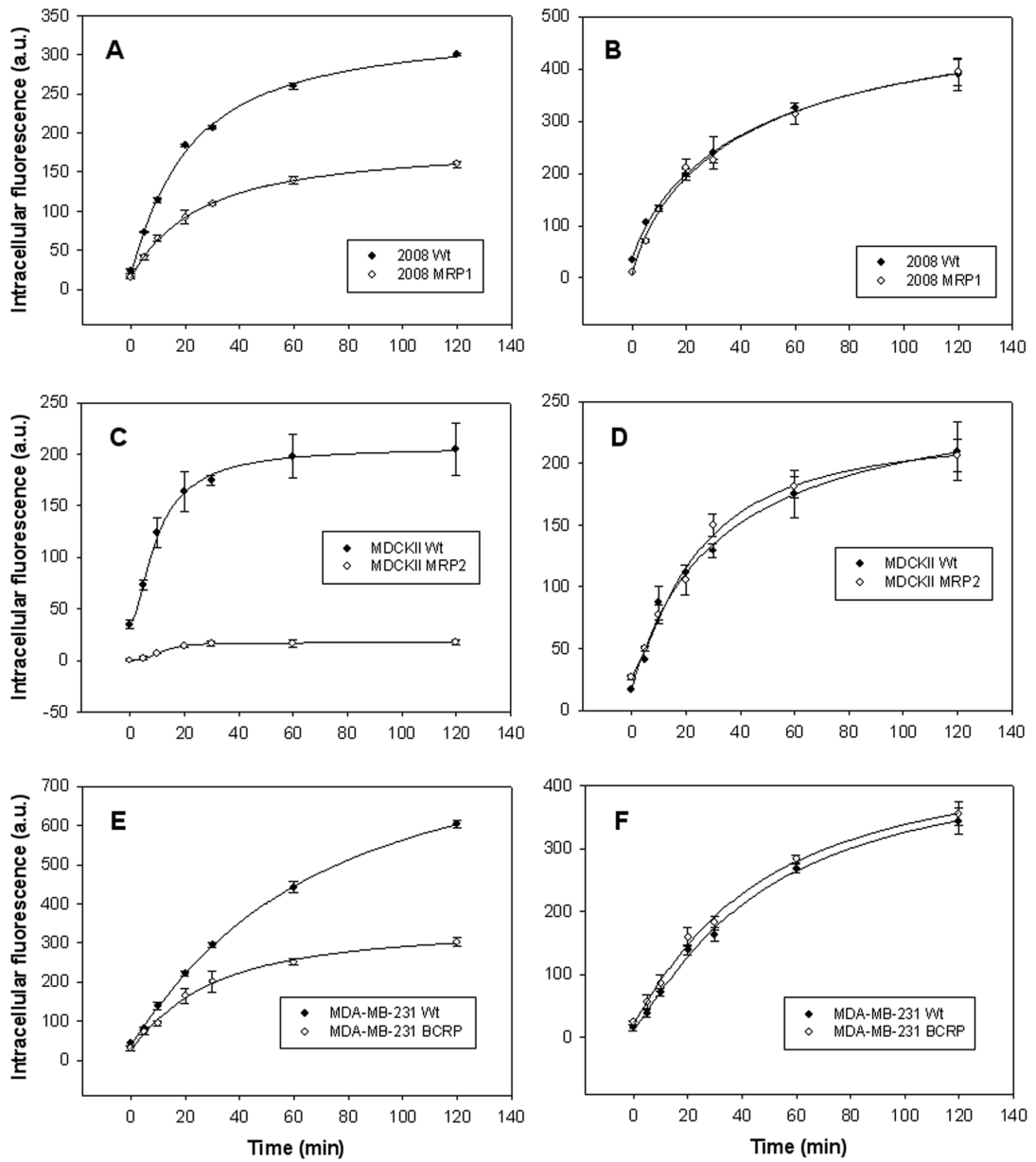


Table 1. Interactions between pairs of Pgp modulators when inhibiting Pgp-mediated DNM transport in intact cells.
 It is shown how increasing fixed concentrations of a second modulator modify the kinetic parameters of Pgp inhibition caused by a first modulator. By a simple analysis of these data, it is possible to determine the type of interaction (competitive, non-competitive, synergistic) that exist between a given pair of Pgp modulators when combined to bring about Pgp inhibition.

2 nd modulator	μM	Hill number	K_i (μM)	2 nd modulator	μM	Hill number	K_i (μM)
Mama12	0	1.07 ± 0.12	1.17 ± 0.13	Verapamil	0	1.06 ± 0.08	0.70 ± 0.11
	0,25	1.11 ± 0.19	1.08 ± 0.17		1	0.86 ± 0.07	0.83 ± 0.15
	0,5	1.10 ± 0.29	0.67 ± 0.12		2	0.68 ± 0.05	1.02 ± 0.22
	1	1.16 ± 0.34	0.34 ± 0.23		3	0.65 ± 0.05	1.93 ± 0.35
Mama12	0	1.49 ± 0.19	0.645 ± 0.031	Csa	0	1.16 ± 0.13	0.65 ± 0.04
	0,125	1.43 ± 0.22	0.708 ± 0.071		0.125	1.08 ± 0.07	0.73 ± 0.03
	0,25	1.36 ± 0.24	0.750 ± 0.128		0.25	1.10 ± 0.10	0.70 ± 0.03
	0,5	1.19 ± 0.12	0.891 ± 0.093		0.5	1.09 ± 0.04	0.74 ± 0.05
Mama12	0	2.73 ± 0.41	26.14 ± 2.62	VNB	0	1.18 ± 0.10	0.77 ± 0.08
	0,25	2.51 ± 0.32	24.86 ± 3.15		5	1.17 ± 0.09	0.74 ± 0.06
	0,5	2.64 ± 0.36	17.66 ± 0.72		10	1.12 ± 0.05	0.66 ± 0.07
	1	2.41 ± 0.38	12.31 ± 1.65		20	1.07 ± 0.12	0.42 ± 0.09
Mama12	0	1.52 ± 0.16	0.113 ± 0.008	GF120918	0	1.25 ± 0.13	0.76 ± 0.06
	0,125	1.71 ± 0.28	0.071 ± 0.007		0.062	1.23 ± 0.23	0.70 ± 0.08
	0,25	1.44 ± 0.34	0.062 ± 0.009		0.125	1.17 ± 0.19	0.47 ± 0.02
	0,5	1.49 ± 0.29	0.045 ± 0.005		0.25	1.27 ± 0.14	0.23 ± 0.07
Mama12	0	2.22 ± 0.24	41.73 ± 7.88	PRG	0	1.28 ± 0.12	0.96 ± 0.07
	0,25	2.15 ± 0.14	37.64 ± 2.42		10	1.32 ± 0.18	2.13 ± 0.38
	0,5	2.39 ± 0.22	27.76 ± 1.83		20	1.91 ± 0.30	1.46 ± 0.18
	1	2.30 ± 0.33	15.61 ± 2.76		30	2.42 ± 0.37	1.36 ± 0.19

Discusión

DISCUSIÓN

Como ya comentamos en la introducción, el fenómeno de **resistencia a múltiples fármacos (MDR)** es la causa del fallo del tratamiento con quimioterapia en alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastático (Longley DB y Johnston PG, 2005), y que una parte significativa de tal fenotipo MDR de tumores es atribuida a la sobre-expresión de la **Glicoproteína-P MDR1 (Pgp)**. En el momento en que se inició el trabajo de la presente Tesis doctoral, ya hacía casi dos décadas que se habían descrito los inhibidores clásicos de Pgp verapamil y ciclosporina A, y realizado los primeros ensayos clínicos con ellos en pacientes reales de cáncer, con los consabidos decepcionantes resultados. También estaban ya descritos, aunque mucho más recientemente, los inhibidores de Pgp de 3ª generación XR9576 (tariquidar) (Mistry P et al., 2001), LY335979 (zosuquidar) (Dantzig AH et al., 1996), y el GF120918 (elacridar) (Hyafil F et al., 1993), entre los más prometedores. Sin embargo, sobre éstos últimos no se había tenido noticia de ensayo clínico alguno sino hasta hace muy poco tiempo, y todos ellos en la fase I y muy limitados en cuanto al número de pacientes involucrados en los ensayos. Los resultados de los susodichos ensayos aún son preliminares, y diseñados más para determinar si poseen o no efectos secundarios, y si modifican la farmacocinética de los anticancerosos, que para comprobar si mejoran la eficacia de los tratamientos del cáncer con quimioterapia (esto es, si revierten MDR).

Durante el desarrollo de la presente Tesis, también hemos sido testigos de un acalorado debate en la comunidad científica a propósito de si los inhibidores de Pgp tendrán o no alguna posibilidad de ser aplicados en clínica (Garraway La y Chabner B, 2002; Murren JR, 2002; Goldman B, 2003). Tampoco faltaron incluso quienes se cuestionaron si a Pgp no se le habría atribuido un papel exagerado en relación con su implicación en el fenómeno MDR (Polgar O y Bates SE, 2005). Estas dudas, a raíz de los decepcionantes resultados de los ensayos clínicos con los inhibidores de 1ª y 2ª generación, estaban más que justificadas, y son un ejercicio útil y sano en toda campo científico que se precie de "buena salud".

En cualquier caso, parece claro que la responsabilidad de este fracaso no puede ser achacada exclusivamente a la ineficacia de los primeros compuestos ensayados, sino también al pobre diseño experimental los ensayos clínicos realizados con ellos.

Como explicamos en su momento en la introducción, aquellos primeros ensayos pretendieron revertir el fenotipo MDR en tumores en los que, primero, no se sabía si había algo que revertir. Y cuando esto se sabía, no se podía asegurar fuera de toda duda que el mecanismo de resistencia no fuera otro diferente a la sobre-expresión de Pgp en los tumores a tratar. En caso de ser así, los compuestos ensayados tendrían poco que hacer como revertidores de MDR. Pero incluso en el caso de que todas las anteriores fuesen variables perfectamente conocidas, la pretensión de revertir el fenotipo MDR no pasa de ser una deficiente estrategia terapéutica. Parece mucho más lógico, por las razones comentadas en su momento, tratar de impedir que el fenotipo MDR llegue a establecerse, en lugar de intentar revertirlo una vez asentado. Esto se conseguiría con el uso de inhibidores de Pgp desde el inicio del tratamiento con anticancerosos, tal y como algunos investigadores han llegado a sugerir a raíz de las evidencias experimentales (Bates SE, 1999; Leonard GD et al., 2003).

Alternativamente, si llegara a demostrarse la imposibilidad de conseguir la reversión *in vivo* del fenotipo MDR de tumores con inhibidores de Pgp, estos compuestos aún tendrían una potencial aplicación clínica que no ha sido ni mucho menos estudiada de manera comparable a la de la reversión de la MDR. Tal aplicación consistiría en usarlos como potenciadores de la absorción oral y de la biodisponibilidad de muchos fármacos (Varma MVS et al., 2003). Este campo de la farmacología ha crecido en repercusión tras reconocerse que Pgp y otros transportadores ABC son fundamentales en la regulación de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de infinidad de fármacos y xenobióticos (Leslie EM et al., 2005). El uso de inhibidores de Pgp podría llegar a ser incluso más interesante con este fin que para revertir la MDR de tumores.

Pero el mejor de los diseños experimentales, o la más prometedora y mejor planificada aplicación farmacológica, serían inútiles sin compuestos inhibidores de Pgp que no cumplan unas mínimas exigencias farmacológicas. Los inhibidores de 3^a

generación parecen satisfacer estas exigencias, pero son muy pocas las moléculas descritas, y su eficacia tanto como revertidores MDR *in vitro*, como moduladores seguros de la farmacocinética y farmacodinámica de otras moléculas, aún está por demostrar. Por ello, el presente **trabajo de tesis doctoral** se ha fijado como **objetivo general el estudio de la actividad de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de *Celastraceae* como potenciales revertidores de la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales**. Dicho estudio se centró en la **caracterización del mecanismo molecular de acción de estos compuestos como inhibidores de la Pgp humana**, con la intención de emplear este conocimiento para el **diseño racional de potentes inhibidores de esta bomba de fármacos basados en la estructura molecular de estos compuestos naturales**.

Los resultados de nuestro trabajo se detallan en el apartado anterior, y a continuación procederemos a su discusión.

1. Reversión del fenotipo MDR in vitro y bloqueo de la actividad de transporte de fármacos de Pgp:

Estudiamos la capacidad de sesquiterpenos naturales para **revertir *in vitro* el fenotipo de resistencia celular a múltiples fármacos (MDR)** en células NIH-3T3 transfectadas con el gen de la **Pgp MDR1** humana. Para ello, realizamos **ensayos de citotoxicidad** consistentes en cultivar las células con concentraciones crecientes de fármacos citotóxicos transportados por Pgp (daunorubicina o vinblastina), en presencia/ausencia de una concentración fija de cada sesquiterpeno estudiado, y cuantificar la supervivencia celular tras 3 días de incubación. Estas células, en virtud de su capacidad para expresar Pgp en las membranas celulares, soportan elevadas concentraciones de citotóxicos (Cardarelli et al., 1995). Pero si la actividad de Pgp es inhibida por un modulador, las células originalmente resistentes a fármacos son sensibilizadas hasta los niveles de resistencia basal propios de las células no transfectadas con el gen de la Pgp, sensibles a fármacos. Cuanta menor sea la concentración de un sesquiterpeno necesaria para producir la reversión de la MDR, tanto más eficaz es el compuesto ensayado como inhibidor de Pgp.

Además, quisimos demostrar que la potencial capacidad de los sesquiterpenos para quimiosensibilizar células MDR, en caso de observarse, se debía a un **bloqueo específico de la actividad de transporte de fármacos de Pgp**, y no a otros efectos inespecíficos como la alteración de las propiedades de permeabilidad de la membrana celular. Para ello, primero estudiamos por **citometría de flujo** cómo los sesquiterpenos modulan la capacidad de Pgp para transportar el fármaco fluorescente daunorubicina a través de la membrana celular en células intactas. Después, seleccionamos aquellos sesquiterpenos naturales que demostraron una mayor potencia inhibidora de la proteína, y estudiamos, *grosso modo*, dónde se unían a la proteína. Con tal fin, **purificamos membranas citoplasmáticas** de células que sobre-expresan altos niveles de Pgp (células de hámster CH^rB30, con un 15% de Pgp en sus membranas). Con ellas realizamos **ensayos de competición entre sesquiterpenos y análogos radiactivos de sustratos con capacidad para unirse covalentemente por fotoafinidad al sitio de unión de fármacos de la proteína**, localizado en los TMDs. Esto permitiría discriminar entre los TMDs y los dominios de unión a ATP (NBDs) como la región de la proteína que albergaba el potencial sitio de unión de sesquiterpenos.

La gran mayoría de sesquiterpenos naturales ensayados, de un total de unos ochenta, demostraron siempre alguna capacidad para sensibilizar células MDR a fármacos anticancerosos, aunque, eso sí, sus respectivas eficiencias como revertidores variaban mucho. Además, se observó que existía una relación lineal entre su eficacia como revertidores del fenotipo MDR y la potencia como inhibidores de la actividad de transporte de fármacos de Pgp en células intactas. Para rematar, vimos también que los más potentes sesquiterpenos inhibían el fotomarcaje de la proteína con análogos radiactivos de sustratos.

Todo esto sugiere, primero, que la actividad revertidora de éstos compuestos naturales está ligada a un bloqueo del transporte de fármacos de Pgp a través de la membrana celular. Además, dada la enorme variedad de sesquiterpenos que demostraron actividad anti-Pgp, parece que el esqueleto dihidro- β -agarofurano posee una estructura tridimensional tal que hace que muchos compuestos diferentes con el mismo esqueleto base sean capaces de funcionar como revertidores MDR.

Pero si en lo cualitativo esto es cierto, cuantitativamente no todos ellos son igualmente eficientes sensibilizando células MDR a citotóxicos, lo que apunta a que tal efecto quimiosensibilizador es el resultado de una interacción de los sesquiterpenos (ligandos) con una diana celular discreta (presumiblemente Pgp) que impone restricciones estéricas a la variedad de estructuras capaces de interactuar con ella de manera óptima. Si, además, los sesquiterpenos competían con otros sustratos por unirse a los TMDs de Pgp, como apuntaban los experimentos de fotomarcaje de la proteína con sustratos radiactivos, todo parecía sugerir ya a estas alturas de la investigación que la supuesta "diana celular discreta" era, a todas luces, la Pgp humana.

Pero aunque todas estas evidencias sugerían que los sesquiterpenos revertían MDR mediante el bloqueo de Pgp por unión directa a sus TMDs, ninguna era tan concluyente que permitiera descartar otras posibles explicaciones. Por ejemplo, la inhibición del fotomarcaje de Pgp con análogos radiactivos de sustratos era explicable, en principio, por una competición real entre moléculas de sesquiterpeno y de análogos por unirse a la proteína. Pero podía también resultar de potenciales alteraciones en la fluidez de la membrana celular causadas por sesquiterpenos, lo que afectarían al modo en que los mencionados análogos se disuelven en la membrana y alcanzan el sitio de unión de fármacos de Pgp (paso previo inevitable de toda molécula capaz de unirse al bolsillo hidrofóbico de Pgp definido por sus TMDs). Y esta misma potencial alteración de las propiedades de fluidez de la membrana celular podría dar cuenta de la actividad revertidora de sesquiterpenos, pues se ha demostrado que la actividad de Pgp está influenciada por las condiciones de fluidez de la bicapa lipídica en la que se encuentra inmersa. Agentes fluidificantes de la membrana celular pueden interferir en la función de Pgp sin que exista ninguna interacción directa con la proteína (Regev R et al., 1999).

2. Transporte de ³H-colchicina mediado por Pgp en vesículas de membrana plasmática:

Aunque los ensayos mediante citometría de flujo mostraban que los sesquiterpenos eran capaces de bloquear la actividad de transporte de Pgp, quisimos medir esta actividad (y la influencia de los sesquiterpenos sobre ella) empleando vesículas de membrana plasmática selladas (obtenidas a partir de células CH⁺B30), que contenían gran cantidad de Pgp, cuantificando la acumulación de colchicina tritiada (análogo radiactivo de un sustrato clásico de la bomba) en el lumen de las vesículas en contra de un gradiente de concentración con gasto de ATP (que proporcionábamos nosotros junto con un sistema enzimático acoplado para regenerarlo). En dichas vesículas, por término medio sólo la mitad de las moléculas de Pgp presentes poseían la orientación adecuada para nuestros fines, esto es, con los NBDs orientados hacia fuera (accesibles al ATP) para que el sentido de transporte ocurriese hacia el interior de las vesículas. En este sistema, existían otras proteínas de membrana además de Pgp, pero ninguna otra que, presumiblemente, pudiese dar cuenta de la actividad de transporte propia de esta bomba. Los sesquiterpenos estudiados demostraron tener potencias inhibitoras de Pgp semejantes a las observadas en los experimentos de citometría con células intactas.

3. Transporte de tetrametilrosamina (TMR) mediado por Pgp purificada y reconstituida en proteoliposomas:

La purificación de la proteína y su reconstitución en proteoliposomas sellados de fosfatidilcolina, permitió medir la actividad de transporte de Pgp y su modulación por sesquiterpenos con ciertas ventajas sobre el sistema de vesículas de membrana explicado anteriormente. Una de ellas era que, en tal sistema, uno estaba seguro de medir la actividad de transporte de la proteína sin interferencia de ningún otro potencial transportador que pudiese estar falseando resultados en el sistema de vesículas en el que, aunque mayoritaria, la Pgp no estaba sola. Pero aún más importante, el uso de un sustrato fluorescente permitía medir su tasa de transporte hacia el interior del proteoliposoma en tiempo real, mientras que el uso de análogos

radiactivos en vesículas sólo permitía medir el resultado final de un proceso de acumulación (el establecimiento del gradiente de concentraciones a un lado y otro de la membrana) cuando ya se había alcanzado el equilibrio entre los procesos de transporte activo hacia el interior (mediado por Pgp) y de difusión pasiva hacia el exterior. La cuantificación de la velocidad del proceso de transporte en los momentos iniciales de la reacción, justo tras la adición de ATP al sistema, era la única manera de poder medir cinéticas y estimar el mecanismo enzimológico de inhibición del transporte por sesquiterpenos, cuando el sistema aún está lejos del equilibrio y existe una dependencia lineal entre la velocidad del proceso y la concentración de sustrato (en este caso, la concentración de fluoróforo en el exterior de los proteoliposomas). Usamos el sustrato de Pgp TMR porque, por su coeficiente de partición en la bicapa del proteoliposoma, su ratio de difusión a través de ella no era excesivamente rápido. Esto habría hecho que su cinética de acumulación hubiese sido demasiado instantánea para poder ser medida en tiempos iniciales, ni se habrían generado gradientes de concentración a un lado y otro de la bicapa lo suficientemente amplios para poder ser medidos en términos de apantallamiento de fluorescencia (la TMR pierde fluorescencia al concentrarse en el interior del proteoliposoma).

Una vez más, los sesquiterpenos demostraron modular la actividad de transporte de Pgp: esta vez de la TMR a través de la membrana de los proteoliposomas. Curiosamente, la inhibición observada a concentraciones crecientes de sesquiterpenos no es lineal, sino que presenta un perfil hiperbólico de saturación típico de las interacciones específicas ligando-receptor o sustrato-enzima. Por lo tanto, podemos afirmar que existe una interacción física entre sesquiterpenos y Pgp. La K_i del proceso de inhibición estaba precisamente en el rango de concentraciones en el que los sesquiterpenos bloquean el transporte y revierten MDR en células intactas, lo que sugiere una vez más que un hecho y el otro están relacionados (los sesquiterpenos revierten MDR porque inhiben la actividad de transporte de Pgp, y no por otras causas). Finalmente, fue posible hacer un análisis enzimológico de la inhibición observada (otra prueba a favor de la interacción física de Pgp y sesquiterpenos), y dió como resultado que los sesquiterpenos funcionan como **inhibidores no competitivos de la actividad de transporte de fármacos.**

4. Medida de la actividad ATPasa de Pgp en vesículas de membrana y en proteoliposomas:

Para comprobar si los sesquiterpenos eran también capaces de modular la otra actividad enzimática de Pgp (su actividad ATPasa), medimos la tasa de liberación de fosfato inorgánico a partir de ATP, tanto en vesículas de membranas celulares purificadas de células CH⁺B30, como en proteoliposomas que contenían Pgp previamente purificada. Esta actividad ATPasa fue medida durante períodos de tiempo en los que la tasa de producción de fosfato se mantenía lineal, y en presencia de una mezcla de inhibidores específicos de otras ATPasas y fosfatasas distintas de Pgp que pudiera contener la membrana celular.

Observamos que la actividad ATPasa de Pgp en vesículas era, en efecto, modulada por sesquiterpenos, pero de una manera **bifásica** para todos los compuestos ensayados: **estimulaban la actividad ATPasa a muy bajas concentraciones, pero luego la inhibían a concentraciones mayores, funcionando entonces como inhibidores no competitivos de la hidrólisis del ATP**. En cambio, en proteoliposomas sólo se observó el efecto inhibitorio. Curiosamente, el verapamil (un revertidor MDR clásico) era capaz de provocar una respuesta bifásica de modulación de ATPasa en ambos sistemas (vesículas y proteoliposomas), por lo que podíamos descartar la posibilidad de que la Pgp previamente purificada y reconstituida en proteoliposomas hubiese sufrido modificaciones que alterasen su conformación nativa.

Esta capacidad de los sesquiterpenos para modular las dos actividades enzimáticas de Pgp (ATPasa y de transporte de fármacos) es la prueba que apoya la idea de una interacción física de estos compuestos naturales con la proteína, pues, al igual que vimos con la actividad de transporte, la inhibición de la actividad ATPasa ejercida por sesquiterpenos no es lineal, y el perfil bifásico de tal modulación sugiere, además, la **existencia de al menos dos sitios de unión de sesquiterpenos a la proteína con distinta afinidad**: uno estimulatorio (de alta afinidad) y otro inhibitorio (con menor afinidad) de la actividad ATPasa.

Es bien sabido que muchos compuestos que son transportados eficientemente por Pgp (aunque no todos) son capaces de estimular concomitantemente su actividad ATPasa en virtud del acoplamiento que existe entre los dominios TMD de unión de fármacos y los NBDs que hidrolizan el ATP. De modo semejante, algunos inhibidores clásicos de la bomba, como el arriba mencionado verapamil, la progesterona o la quinidina, a pesar de ser tales "inhibidores", estimulan mucho su actividad ATPasa precisamente en el rango de concentraciones en el que ejercen su efecto revertidor de MDR. Al parecer, esto ocurre así porque tales compuestos, más que bloqueadores de la actividad de transporte, se comportan como competidores que se unen preferentemente al sitio de unión de fármacos, ocupando el lugar de los citotóxicos. De esta forma, promueven su propia translocación por parte de Pgp, impidiendo así el flujo neto de los otros fármacos a través de la membrana. Pero no detienen la actividad de transporte, que en realidad sigue funcionando, aunque empleada en ciclos fútiles de translocación que consumen ATP.

Los sesquiterpenos ensayados no parece que se comporten del mismo modo, porque no son inhibidores competitivos del transporte de fármacos (como vimos arriba), porque no se observó en ningún caso que estimularan la actividad ATPasa de manera comparable (propio de compuestos que si son transportados por la bomba), y el rango de concentraciones en que revierten MDR coincide con aquél en el que provocan la inhibición de la actividad ATPasa (no su estimulación). Por ello, los sesquiterpenos no deben funcionar compitiendo con los anticancerosos por ser transportados por Pgp, sino como bloqueadores reales de la actividad de transporte de la bomba.

Otra cuestión que quedaba por responder era la de si la inhibición del transporte de fármacos era debida a un bloqueo de la hidrólisis del ATP en los NBDs (bloqueo del motor de la bomba). Dado que la inhibición que los sesquiterpenos causan en ambas actividades (de transporte de fármacos y ATPasa) sucedía en el mismo rango de concentración, era factible que el bloqueo del transporte se debiera a un bloqueo del "motor" de la bomba inducido por sesquiterpenos, más que a un impedimento causado por los sesquiterpenos a la unión de fármacos a los TMDs. Sin embargo, al comparar el porcentaje de una y otra actividad a concentraciones crecientes de fármacos, se observó que la actividad de transporte de fármacos caía mucho más

rápido que la ATPasa, tanto en vesículas de membrana como en proteoliposomas. Además, mientras que el transporte se anulaba por completo a concentraciones crecientes de sesquiterpenos, siempre quedaba un remanente de actividad ATPasa que no era posible inhibir por más que la concentración de inhibidor aumentase. Esto apunta, primero, a que el sitio de unión de sesquiterpenos y el de ATP son físicamente diferente en la proteína (como ya sugería el análisis enzimológico de la inhibición de ATPasa mencionado arriba), y segundo, que la inhibición de la actividad de transporte es la causa, y no la consecuencia, de la disminución de actividad ATPasa observada.

Que ocurriera una caída en el transporte como consecuencia de un bloqueo del "motor ATPasa" no hubiese sido descabellado, pues sin motor no hay bomba. Pero que ocurra precisamente lo contrario (que falle la bomba y entonces lo haga el motor) se explica por la ya sugerida comunicación existente, en ambos sentidos, entre los TMDs y los NBDs del transportador en virtud de los cambios conformacionales que se transmiten de un dominio de la proteína al otro durante el ciclo de transporte de fármacos.

5. Ensayos de "binding" de sesquiterpenos y sustratos de Pgp a la proteína purificada:

La purificación de la Pgp es una tarea laboriosa, por las dificultades que entraña extraer de la membrana celular (típicamente con detergentes) a una proteína integral de la membrana tan firmemente inserta en ella como lo está Pgp, pero sin desnaturalizarla en el proceso. Además, el detergente empleado debe ser lo suficientemente fuerte como para lograr la extracción de la proteína de la membrana, pero sin eliminar el "anillo" mínimo de lípidos que rodea a la proteína, y que es en buena parte responsable de su funcionalidad y de su integridad estructural. Una vez conseguido esto, la proteína puede reconstituirse en proteoliposomas para formar un modelo de membrana celular con el que realizar ensayos de transporte, como vimos arriba.

Pero también puede optarse por conservar la proteína en solución en su estado nativo funcional, permitiendo la inserción espontánea de las moléculas de

Pgp en solución de detergente a micelas de fosfolípido. Inserta en tales micelas, Pgp se encuentra en un ambiente lipídico muy semejante a aquel que debe disfrutar en una membrana (excepto por el hecho de que en una solución micelar no existe estructura organizada que permita un transporte vectorial alguno). Pgp en solución y asociada a micelas de fosfolípido conserva aún su capacidad para hidrolizar ATP, y esta es todavía estimulable por verapamil. Esto indica que debe conservar su estado nativo, pues Pgp aún conserva funcionales sus sitios de unión para ligandos (ATP y fármacos). En tal circunstancia, sería factible titular una solución tal de Pgp funcional (receptor) con concentraciones crecientes de sesquiterpenos, o de ATP, o de sustratos fluorescentes (ligandos), y medir los cambios conformacionales resultantes. Esto es así porque las proteínas no son estructuras rígidas, y la unión de todo ligando a su receptor induce en ellas estos cambios, que a menudo son mensurables por el apantallamiento (disminución) de la fluorescencia intrínseca de sus residuos de triptófano (Trp). Otra forma de medirlos mediante espectroscopía de fluorescencia es uniendo covalentemente a un residuo específico de la proteína (a menudo al grupo -SH de cisteínas) una sonda cuya fluorescencia es también sensible a los cambios conformacionales. De hecho, tales apantallamientos, tanto de la fluorescencia intrínseca de los Trp como de sondas covalentes (MANT, NBD, etc.) han sido medidos en Pgp cuando une ATP (o algunos de sus análogos) y sustratos/moduladores.

Nosotros aprovechamos esta tecnología para demostrar *in situ* la unión física de los sesquiterpenos a la Pgp y, si era posible, medir su constante de disociación (K_d). Lo primero sí fue posible, como lo demuestran las curvas hiperbólicas de apantallamiento saturable de fluorescencia, tanto de los Trp (3 en Pgp con posibilidad de emitir fluorescencia) como del grupo fluorescente MANT unido covalentemente a los NBDs de la proteína. Esto ratifica fuera de toda duda la interacción física de sesquiterpenos con la Pgp humana. Pero la amplitud del apantallamiento observado, y el valor de las constantes de disociación medidas para los sesquiterpenos más potentes, merecen una explicación aparte.

La amplitud del apantallamiento de fluorescencia es, al menos en teoría, una medida de la magnitud del cambio conformacional que provoca la unión de un ligando dado a su receptor. Para muchos sustratos clásicos de Pgp (rhodamina 123,

ATP, etc.), la magnitud de dicho cambio es muy aparente (pérdida del 50-90% de la intrínseca fluorescencia original). En cambio, los cambios conformacionales inducidos por la unión de los sesquiterpenos ensayados causaron apantallamientos de la fluorescencia de Trp y de la sonda MANT de menos del 10% de la fluorescencia original. Esto puede significar que el cambio conformacional que causan los sesquiterpenos en Pgp es mucho más sutil que el causado por la unión de sustratos clásicos, lo que apunta a que el sitio de unión de unos y de otros es diferente. También conviene decir que la magnitud del cambio conformacional no tiene por qué estar relacionada proporcionalmente con la magnitud de la consecuencia de ese cambio, pues dicho cambio sutil parece más que suficiente para inhibir alostéricamente tanto la actividad ATPasa como de transporte de fármacos de la proteína.

En cuanto a la afinidad de los sesquiterpenos por la proteína, nos sorprendió bastante obtener valores de K_d de 10 a 100 veces mayores que los de sus constantes de inhibición de las actividades ATPasa y de transporte de fármacos en vesículas de membrana, proteoliposomas y células intactas. No tiene sentido que un ligando produzca un efecto confirmado sobre la actividad de su receptor a una concentración a la que aún no ha podido saturar la unión de ni tan solo una mínima fracción de las moléculas de receptor presentes, salvo que los sesquiterpenos funcionasen "homeopáticamente" (cosa que le encantaría a mucho charlatán pseudo-científico con ánimo de lucro). La explicación a esta aparente discrepancia de resultados radica en la forma en que los compuestos interactúan con Pgp: éstos deben ser capaces, primero, de difundir entre las moléculas de la bicapa lipídica, para luego unirse al sitio de unión correspondiente en la proteína. La afinidad de esta unión dependerá, por un lado, del número, fortaleza y distribución tridimensional de los elementos de interacción molecular que estabilizan la unión entre el bolsillo de unión de fármacos de Pgp y sus ligandos. Pero también depende de la concentración efectiva que el ligando alcance en la matriz de la membrana celular, y que dependerá a su vez del coeficiente de partición ($\log P$) del compuesto entre la fase acuosa y la bicapa lipídica. De hecho, la concentración de moléculas de los sustratos de Pgp en la bicapa debe ser mucho mayor que la existente en la fase acuosa, dado que típicamente son moléculas hidrofóbicas. Así, una muy baja

concentración de compuesto en el medio acuoso puede ser más que suficiente para saturar la unión a Pgp, pues la molécula alcanzará una concentración efectiva mucho mayor en el seno de la membrana celular que en el medio extracelular.

Volviendo a nuestra medida de la K_d para la unión de sesquiterpenos a la Pgp, los valores obtenidos obviamente infravaloran la afinidad real de estos compuestos por la proteína, pues la medida de ésta se efectuó en un sistema en el que Pgp estaba desprovista de una matriz membranosa en la que estar embebida, lo que privó a los sesquiterpenos de un entorno hidrofóbico en el que poder concentrarse hasta los niveles necesarios para reconciliar los datos de afinidad (basados en la concentración en la fase acuosa) con los de potencia inhibidora de Pgp.

Finalmente, estudiamos también cómo la unión de sesquiterpenos a Pgp afectaba, a su vez, a la unión de otros sustratos a la proteína. Seleccionamos el compuesto Hoechst 33342 y el análogo fluorescente de ATP, TNP-ATP. Ambos son capaces de emitir una fluorescencia intensa sólo cuando se encuentran en un entorno hidrofóbico, como el sitio de unión de una proteína, por lo que se pueden hacer ensayos de "binding" a soluciones de Pgp purificada y monitorizar la unión por el incremento de fluorescencia a concentración creciente de compuesto. Pero aún más interesante es que cada fluoróforo se une a un sitio diferente de Pgp (Hoechst 33342 a los TMDs y TNP-ATP, lógicamente, a los NBDs), por lo que podíamos así estudiar si los sesquiterpenos, además de inhibir el transporte y la ATPasa de Pgp, también afectan a la unión de moléculas a uno y otro dominio. Los resultados demostraron que los sesquiterpenos no afectan a la unión de TNP-ATP al sitio activo de los NBDs, lo que corrobora que los sesquiterpenos no comparten sitio de unión con el ATP, pero sugieren también que tampoco afectan a su unión, ni siquiera por efectos alostéricos. En cambio, la unión del Hoechst 33342 a Pgp sí se vio afectada a concentraciones crecientes de sesquiterpenos. Desconocemos si este impedimento es estérico (interacción física directa) o alostérico, aunque ya vimos que los sesquiterpenos son inhibidores no competitivos del transporte de fármacos (al menos de aquellos que, como la TMR, se unen al "sitio R" de los TMDs), lo que apunta a un efecto alostérico.

6. Medición *in situ* de la capacidad de Pgp para transportar sesquiterpenos:

Las células MDR que sobre-expresan Pgp no manifiestan resistencia cruzada a los sesquiterpenos más potentes inhibidores de la proteína. Si a esto añadimos el resto de evidencias bioquímicas obtenidas (inhibición no competitiva del transporte de fármacos, muy débil o nula estimulación de la actividad ATPasa), todo parecía sugerir que los sesquiterpenos no son transportados por Pgp. Sin embargo, para poder tener una evidencia directa de ello y medir *in situ* el potencial transporte de estos compuestos por Pgp, necesitábamos tener una forma de seguirles la pista en ensayos de transporte de fármacos en células intactas. Ninguno de los sesquiterpenos naturales estudiados poseía fluorescencia intrínseca, así que el laboratorio de los Dres. Antonio Jiménez e Isabel Bazzocchi (donde se aíslan y elucidan las estructuras moleculares de estos compuestos estudiados en esta tesis) nos proveyó de un sesquiterpeno modificado covalentemente con una sonda fluorescente. A pesar de la modificación covalente, éste análogo fluorescente de sesquiterpeno conservaba prácticamente intactas las propiedades de inhibición de Pgp de la molécula precursora natural. Así, con esta nueva herramienta demostramos que Pgp, en condiciones de sobre-expresión moderada, no era capaz de transportar la sonda a través de la membrana celular, ni ésta veía alterado su patrón de distribución intracelular debido a la sobre-expresión de la proteína (era indistinguible entre células NIH-3T3 Pgp⁺ como en Pgp⁻). Sólo cuando usamos una línea celular en la que Pgp se sobre-expresa exageradamente (5% de las proteínas totales de la membrana), observamos que el transportador era capaz de afectar ligeramente la tasa de acumulación del fluoróforo por simple difusión, y de expulsar activamente el compuesto del interior de las células, aunque con una eficiencia mucho más baja que comparado con sustratos clásicos como la daunorubicina.

Esto significa que, después de todo, no se puede afirmar que Pgp sea incapaz de transportar sesquiterpenos, aunque, de hacerlo, lo hace con muy escasa eficiencia. Tampoco se puede descartar que el motivo fluorescente no esté contribuyendo al transporte por parte de Pgp de una molécula que, de otro modo, no sería sustrato de la bomba. Lo que creemos más probable es que la eficiencia de un sesquiterpeno

para ser transportado va a ser inversamente proporcional a su potencia inhibidora de la bomba. Un ligando con una afinidad excesiva por su receptor acaba por ser un inhibidor de facto, pues la constante de disociación es tan baja que la mayor parte de moléculas de ligando se encuentran acomplejadas con su receptor e indisociables del mismo. De la misma forma, puesto que la potencia inhibidora de un compuesto se relaciona con su afinidad, los sesquiterpenos que mejor inhiben Pgp son los más afines a ella y, en consecuencia, su tasa de transporte debe ser insignificante o nula. La razón de que el sesquiterpeno fluorescente demostrase ser transportado (aunque mínimamente) por Pgp puede deberse a que su potencia inhibidora era modesta en comparación con la de otros sesquiterpenos naturales estudiados en la presente Tesis. De haber sido comparable a la de aquellos, posiblemente no hubiésemos sido capaces de detectar transporte alguno por parte de Pgp.

7. Especificidad de acción de los sesquiterpenos como inhibidores de Pgp:

Hemos comprobado que ninguno de los sesquiterpenos más potentes inhibiendo Pgp posee una actividad comparable sobre otros transportadores ABC humanos de múltiples fármacos con los que Pgp guarda homología, tanto por su secuencia como por la función fisiológica que desempeñan. Estos transportadores son las ya mencionadas proteínas MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) y BCRP (ABCG2). Ninguna de ellas fue, a su vez, capaz de transportar apreciablemente al análogo de sesquiterpeno fluorescente en comparación con sustratos clásicos de cada una de ellas. Todo esto sugiere que los sesquiterpenos estudiados son muy selectivos por Pgp, y que el efecto inhibitorio que ejercen sobre esta proteína resulta de una interacción física y específica con dicho transportador, como ya apuntan toda otra serie de evidencias ya comentadas. Si esto no fuera así, y la capacidad revertidora de los sesquiterpenos se debiera a efectos inespecíficos sobre las membranas biológicas, todas estas proteínas verían afectadas sus actividades respectivas de transporte de fármacos, y no sólo Pgp.

La especificidad de acción de estos compuestos naturales es muy importante desde el punto de vista de su potencial aplicación terapéutica, pues las 4 proteínas

mencionadas desempeñan funciones análogas en el organismo: aunque sus respectivos espectros de reconocimiento de sustratos difieran y, a lo sumo, solapen solo parcialmente, trabajando conjuntamente pueden compensar la función de una de ellas perdida transitoriamente (como ocurriría en un paciente tratado con un inhibidor de Pgp). De esta manera, pueden ofrecer una protección parcial frente a xenobióticos, y contribuir a la eliminación de fármacos del organismo, a pesar de que una de ellas no sea funcional por un tiempo. En cambio, un inhibidor inespecífico bloquearía indiscriminadamente la función protectora de más de una de ellas, y dejaría al paciente peligrosamente expuesto a un incremento de toxicidad intolerable de fármacos que, en condiciones normales, serían bien tolerados. Del mismo modo, la administración simultánea de fármacos anticancerosos e inhibidores de Pgp de 1ª y 2ª generación provocaban nefastas interacciones farmacológicas que ponían en peligro la vida de los pacientes tratados al incrementarse la toxicidad de la quimioterapia más allá de los límites de tolerabilidad. En cambio, algunos de los nuevos inhibidores de 3ª generación no producen este efecto, debido a su especificidad de acción por Pgp. En este sentido, los sesquiterpenos naturales son muy prometedores.

8. Mapeo del sitio(s) de unión de sesquiterpenos en la Pgp MDR1 humana:

Realizamos un **estudio bioquímico de las actividades de transporte de fármacos de Pgp en presencia de sesquiterpenos naturales**, solos o en combinación con otros moduladores clásicos. Pretendíamos, por una parte, ratificar nuestros hallazgos sobre el mecanismo de acción de sesquiterpenos como inhibidores no competitivos de la actividad ATPasa y de transporte de fármacos, que se unen a los TMDs pero no a los dominios NBD. Y, por otra parte, quisimos establecer la relación del sitio(s) de unión de sesquiterpenos y el de otros sustratos y moduladores de Pgp previamente caracterizados. La información obtenida podría ser útil para el futuro diseño de un modelo QSAR que se base en la estructura de éstos compuestos naturales.

Nuestras conclusiones confirmaron la existencia de dos sitios de unión para sesquiterpenos, uno de alta y otro de menor afinidad, localizados en los dominios TMD, y al menos uno de ellos (posiblemente el de menor afinidad) solapa físicamente con el sitio de unión de verapamil y ciclosporina A (farmacóforo 1). En cambio, ambos sitios de unión son físicamente diferentes del de vinblastina. Este fármaco anticanceroso posee un gran volumen molecular, motivo por el cual ocupa aparentemente una región mayor dentro del bolsillo hidrofóbico que abarcaría los llamados sitios H y R de unión de fármacos (para Hoechst 33342 y colchicina, por un lado, y para rodaminas y antraciclinas, por el otro). Este hecho concuerda con nuestras evidencias que apuntaban a que los sesquiterpenos no se unen al sitio R (no compiten el transporte de TMR), y sugieren que el estorbo de la unión de Hoechst 33342 a Pgp causado por sesquiterpenos es debido a un efecto alostérico, y no a una interacción física.

Finalmente, los sesquiterpenos tampoco solapan físicamente en su unión a Pgp con ninguno de los dos sitios de unión que progesterona posee en el transportador (uno en los TMDs y otro en los NBDs), ni tampoco con el inhibidor de 3ª generación GF120918, con quien, de hecho, producen una interacción sinérgica que beneficia mutuamente a ambos tipos de moléculas en su inhibición de Pgp.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1) Los **sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos** de plantas de la familia *Celastraceae* estudiados en la presente tesis doctoral han demostrado una actividad significativa como **revertidores del fenotipo MDR mediado por la Glicoproteína-P humana (Pgp) en células tumorales**, con actividades comparables, y en algunos casos muy superiores, a la del revertidor clásico verapamil. Los más activos revertidores identificados fueron los compuestos **Mama5, Mama12 y Machu4**.

2) Los sesquiterpenos revierten el fenotipo MDR en células tumorales que sobre-expresan Pgp porque **bloquean su actividad de transporte de fármacos** tanto en células intactas, como en vesículas de membrana plasmática, y en proteoliposomas con la proteína purificada y reconstituida.

3) Los sesquiterpenos son **selectivos para Pgp**, pues, en el rango de concentraciones en que inhiben a esta proteína son, en cambio, incapaces de bloquear las actividades de los transportadores humanos homólogos MRP1, MRP2 y BCRP.

4) Estos compuestos naturales son capaces de modular también la **actividad ATPasa** del transportador, pero de una manera **bifásica**: estimulan ligeramente dicha actividad a concentraciones muy bajas, pero funcionan como **inhibidores no competitivos** a mayores concentraciones, que coinciden, precisamente, con el rango de concentración en el que revierten el fenotipo MDR en células intactas.

5) La unión de sesquiterpenos a los TMDs de la proteína provoca en ella **sutiles cambios conformacionales que afectan a la hidrólisis pero no a la unión del ATP** a los dominios de unión a nucleótido (NBDs). En cambio dicha unión **sí afecta tanto al transporte de fármacos como a su unión a los TMDs**: esto sugiere

que el bloqueo del transporte podría ser consecuencia de un impedimento de la unión apropiada de fármacos a la proteína.

6) Los sesquiterpenos poseen, al menos, **dos sitios de unión en los TMDs de la proteína con diferente afinidad cada uno**, lo que explicaría el perfil bifásico observado en su capacidad para modular su actividad ATPasa. Dichos sitios de unión solapan físicamente con el de los inhibidores clásicos verapamil y ciclosporina A, pero son físicamente diferente de los sitios de unión de vinblastina, de progesterona (tanto en TMDs como en NBDs), y del inhibidor de 3ª generación GF120918.

7) Pgp no confiere resistencia cruzada a los sesquiterpenos naturales estudiados en aquellas células en las que se sobre-expresa. Ello es debido a que Pgp, son incapaces de transportar sesquiterpenos, o lo hacen sólo muy pobremente en comparación con los sustratos clásicos de la bomba.

Bibliografía

- Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, Burt M and Scotto KW (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res* **5**:3352-6.
- Advani R, Fisher GA, Lum BL, Hausdorff J, Halsey J, Litchman M and Sikic BI (2001) A phase I trial of doxorubicin, paclitaxel, and valspodar (PSC 833), a modulator of multidrug resistance. *Clin Cancer Res* **7**:1221-9.
- Advani R, Visani G, Milligan D, Saba H, Tallman M, Rowe JM, Wiernik PH, Ramek J, Dugan K, Lum B, Villena J, Davis E, Paietta E, Litchman M, Covelli A, Sikic B and Greenberg P (1999) Treatment of poor prognosis AML patients using PSC833 (valspodar) plus mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (PSC-MEC). *Adv Exp Med Biol* **457**:47-56.
- Allen JD and Schinkel AH (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* **1**:427-34.
- Ambudkar SV, Cardarelli CO, Pashinsky I and Stein WD (1997) Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. *J Biol Chem* **272**:21160-6.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I and Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:361-98.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE and Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**:7468-85.
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA and McLeod HL (2001) MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* **11**:217-21.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE and Welsh MJ (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**:202-5.
- Andoh T, Ishii K, Suzuki Y, Ikegami Y, Kusunoki Y, Takemoto Y and Okada K (1987) Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:5565-9.
- Bakken GA and Jurs PC (2000) Classification of multidrug-resistance reversal agents using structure-based descriptors and linear discriminant analysis. *J Med Chem* **43**:4534-41.

- Bakos E, Hegedus T, Hollo Z, Welker E, Tusnady GE, Zaman GJ, Flens MJ, Varadi A and Sarkadi B (1996) Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **271**:12322-6.
- Balakrishnan L, Venter H, Shilling RA and van Veen HW (2004) Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake. *J Biol Chem* **279**:11273-80.
- Balayssac D, Authier N, Cayre A and Coudore F (2005) Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol Lett* **156**:319-29.
- Bates SE (1999) Drug resistance: still on the learning curve. *Clin Cancer Res* **5**:3346-8.
- Bates SE, Mickley LA, Chen YN, Richert N, Rudick J, Biedler JL and Fojo AT (1989) Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: modulation by retinoic acid-induced differentiation. *Mol Cell Biol* **9**:4337-44.
- Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M and Riordan JR (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**:809-18.
- Beketic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G, Dumontet C and Sikic BI (1995) Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833. *J Natl Cancer Inst* **87**:1593-602.
- Belfield GP, Ross-Smith NJ and Tuite MF (1995) Translation elongation factor-3 (EF-3): an evolving eukaryotic ribosomal protein? *J Mol Evol* **41**:376-87.
- Bezombes C, Maestre N, Laurent G, Levade T, Bettaieb A and Jaffrezou JP (1998) Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833. *Faseb J* **12**:101-9.
- Blackmore CG, McNaughton PA and van Veen HW (2001) Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol Membr Biol* **18**:97-103.
- Blagosklonny MV (2005) Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents. *Trends Pharmacol Sci* **26**:77-81.
- Bogenrieder T and Herlyn M (2003) Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**:6524-36.
- Bohme M, Buchler M, Muller M and Keppler D (1993) Differential inhibition by cyclosporins of primary-active ATP-dependent transporters in the hepatocyte canalicular membrane. *FEBS Lett* **333**:193-6.

- Bolhuis H, van Veen HW, Molenaar D, Poolman B, Driessen AJ and Konings WN (1996) Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *Embo J* **15**:4239-45.
- Bond TD, Higgins CF and Valverde MA (1998) P-glycoprotein and swelling-activated chloride channels. *Methods Enzymol* **292**:359-70.
- Boote DJ, Dennis IF, Twentyman PR, Osborne RJ, Laburte C, Hensel S, Smyth JF, Brampton MH and Bleehen NM (1996) Phase I study of etoposide with SDZ PSC 833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer. *J Clin Oncol* **14**:610-8.
- Bradley G and Ling V (1994) P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **13**:223-33.
- Brigle KE, Spinella MJ, Sierra EE and Goldman ID (1995) Characterization of a mutation in the reduced folate carrier in a transport defective L1210 murine leukemia cell line. *J Biol Chem* **270**:22974-9.
- Brown JM and Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**:231-7.
- Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E and Sorrentino BP (1998) Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* **92**:2269-79.
- Burkhart CA, Kavallaris M and Band Horwitz S (2001) The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* **1471**:01-9.
- Cairns RA, Khokha R and Hill RP (2003) Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* **3**:659-71.
- Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R and Roninson IB (1987) Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* **77**:142-4.
- Callies S, de Alwis DP, Mehta A, Burgess M and Aarons L (2004) Population pharmacokinetic model for daunorubicin and daunorubicinol coadministered with zosuquidar.3HCl (LY335979). *Cancer Chemother Pharmacol* **54**:39-48.
- Campos L, Guyotat D, Jaffar C, Solary E, Archimbaud E and Treille D (1992) Correlation of MDR1/P-170 expression with daunorubicin uptake and sensitivity of leukemic progenitors in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* **48**:254-8.
- Canal P, Chatelut E and Guichard S (1998) Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy. *Drugs* **56**:1019-38.

- Cardarelli CO, Aksentijevich I, Pastan I and Gottesman MM (1995) Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. *Cancer Res* **55**:1086-91.
- Chabner BA and Roberts TG, Jr. (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**:65-72.
- Chami M, Steinfels E, Orelle C, Jault JM, Di Pietro A, Rigaud JL and Marco S (2002) Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **315**:1075-85.
- Chan HS, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H and Ling V (1991) P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* **325**:1608-14.
- Chan HS, Thorner PS, Haddad G and Ling V (1990) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* **8**:689-704.
- Chan LM, Lowes S and Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**:25-51.
- Chaney SG and Sancar A (1996) DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* **88**:1346-60.
- Chang G and Roth CB (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**:1793-800.
- Chao NJ, Aihara M, Blume KG and Sikic BI (1990) Modulation of etoposide (VP-16) cytotoxicity by verapamil or cyclosporine in multidrug-resistant human leukemic cell lines and normal bone marrow. *Exp Hematol* **18**:1193-8.
- Chaudhary PM and Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**:85-94.
- Chaudhary PM and Roninson IB (1993) Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* **85**:632-9.
- Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K and Roninson IB (1989) Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol* **9**:3808-20.
- Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I and Gottesman MM (1990) Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem* **265**:221-6.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I and Gottesman MM (1992) Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* **255**:459-62.

- Chong AS, Markham PN, Gebel HM, Bines SD and Coon JS (1993) Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* **36**:133-9.
- Choo EF, Leake B, Wandel C, Imamura H, Wood AJ, Wilkinson GR and Kim RB (2000) Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab Dispos* **28**:655-60.
- Cianchetta G, Singleton RW, Zhang M, Wildgoose M, Giesing D, Fravolini A, Cruciani G and Vaz RJ (2005) A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *J Med Chem* **48**:2927-35.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**:1650-4.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR and Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* **38**:1277-87.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR and Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:695-8.
- Cortes-Selva F, Campillo M, Reyes CP, Jimenez IA, Castanys S, Bazzocchi IL, Pardo L, Gamarro F and Ravelo AG (2004) SAR studies of dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance phenotype in a Leishmania tropica line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J Med Chem* **47**:576-87.
- Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I and Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **55**:929-37.
- Dalmas O, Orelle C, Foucher AE, Geourjon C, Crouzy S, Di Pietro A and Jault JM (2005) The Q-loop disengages from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA. *J Biol Chem*.
- Damiani D, Michieli M, Ermacora A, Russo D, Fanin R, Zaja F, Baraldo M, Pea F, Furlanut M and Bacarani M (1998) Adjuvant treatment with cyclosporin A increases the toxicity of chemotherapy for remission induction in acute non-lymphocytic leukemia. *Leukemia* **12**:1236-40.
- Dano K (1972) Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo. *Cancer Chemother Rep* **56**:701-8.

- Dantzig AH, Law KL, Cao J and Starling JJ (2001) Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* **8**:39-50.
- Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, Law KL, Ehlhardt WJ, Baughman TM, Bumol TF and Starling JJ (1996) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* **56**:4171-9.
- Dantzig AH, Shepard RL, Law KL, Tabas L, Pratt S, Gillespie JS, Binkley SN, Kuhfeld MT, Starling JJ and Wrighton SA (1999) Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:854-62.
- Davidson AL and Chen J (2005) Structural biology. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* **308**:963-5.
- de Bruijn MH, Van der Blik AM, Biedler JL and Borst P (1986) Differential amplification and disproportionate expression of five genes in three multidrug-resistant Chinese hamster lung cell lines. *Mol Cell Biol* **6**:4717-22.
- de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R and Bates SE (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* **146**:117-26.
- Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**:1156-66.
- Dearden JC, Al-Noobi A, Scott AC and Thomson SA (2003) QSAR studies on P-glycoprotein-regulated multidrug resistance and on its reversal by phenothiazines. *SAR QSAR Environ Res* **14**:447-54.
- Desoize B and Jardillier J (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* **36**:193-207.
- Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC and Owen MJ (1997) T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* **150**:91-7.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C and Levine AJ (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* **4**:42-6.
- Doerrler WT and Raetz CR (2002) ATPase activity of the MsbA lipid flippase of Escherichia coli. *J Biol Chem* **277**:36697-705.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15665-70.

- Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M and Huber H (1996) Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood* **88**:1747-54.
- Driessen AJ, Rosen BP and Konings WN (2000) Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends Biochem Sci* **25**:397-401.
- Duan H, Takaishi Y, Imakura Y, Jia Y, Li D, Cosentino LM and Lee KH (2000) Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucom* and *Tripterygium wilfordii*: a new class of potent anti-HIV agents. *J Nat Prod* **63**:357-61.
- Duan H, Takaishi Y, Momota H, Ohmoto Y, Taki T, Jia Y and Li D (2001) Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii*. *J Nat Prod* **64**:582-7.
- Durand RE and Olive PL (2001) Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods Cell Biol* **64**:211-33.
- Eckford PD and Sharom FJ (2005) The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J*.
- Ekins S, Kim RB, Leake BF, Dantzig AH, Schuetz EG, Lan LB, Yasuda K, Shepard RL, Winter MA, Schuetz JD, Wikel JH and Wrighton SA (2002) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **61**:964-73.
- Eliason JF, Ramuz H and Kaufmann F (1990) Human multi-drug-resistant cancer cells exhibit a high degree of selectivity for stereoisomers of verapamil and quinidine. *Int J Cancer* **46**:113-7.
- Evan GI and Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**:342-8.
- Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, Lundell GF, Veber DF, Anderson PS, Chang RS and et al. (1988) Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem* **31**:2235-46.
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* **83**:375-83.
- Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, Paulusma CC, Oude Elferink RP, Baas F, Schinkel AH and Borst P (1998) Drug export activity of the human

- canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* **101**:1310-9.
- Ferry DR, Traunecker H and Kerr DJ (1996) Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer* **32A**:1070-81.
- Fink D, Aebi S and Howell SB (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* **4**:1-6.
- Fischer V, Rodriguez-Gascon A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D and Vickers AE (1998) The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite. *Drug Metab Dispos* **26**:802-11.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ and Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **148**:1237-47.
- Fojo AT, Whang-Peng J, Gottesman MM and Pastan I (1985) Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:7661-5.
- Ford JM, Prozialeck WC and Hait WN (1989) Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Mol Pharmacol* **35**:105-15.
- Fracasso PM, Goldstein LJ, de Alwis DP, Rader JS, Arquette MA, Goodner SA, Wright LP, Fears CL, Gazak RJ, Andre VA, Burgess MF, Slapak CA and Schellens JH (2004) Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies. *Clin Cancer Res* **10**:7220-8.
- Fracasso PM, Westervelt P, Fears CL, Rosen DM, Zuhowski EG, Cazenave LA, Litchman M and Egorin MJ (2000) Phase I study of paclitaxel in combination with a multidrug resistance modulator, PSC 833 (Valspodar), in refractory malignancies. *J Clin Oncol* **18**:1124-34.
- Friche E, Danks MK, Schmidt CA and Beck WT (1991) Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* **51**:4213-8.
- Fromm MF (2002) Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk. *Toxicology* **181-182**:299-303.
- Fromm MF (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* **25**:423-9.
- Ganapathi R and Grabowski D (1983) Enhancement of sensitivity to adriamycin in resistant P388 leukemia by the calmodulin inhibitor trifluoperazine. *Cancer Res* **43**:3696-9.

- Garraway LA and Chabner B (2002) MDR1 inhibition: less resistance or less relevance? *Eur J Cancer* **38**:2337-40.
- Garrigues A, Escargueil AE and Orlowski S (2002) The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10347-52.
- Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F and Orlowski S (2002) Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **62**:1288-98.
- Gassmann P, Enns A and Haier J (2004) Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie* **27**:577-82.
- Gerlach JH, Bell DR, Karakousis C, Slocum HK, Kartner N, Rustum YM, Ling V and Baker RM (1987) P-glycoprotein in human sarcoma: evidence for multidrug resistance. *J Clin Oncol* **5**:1452-60.
- Germann UA, Ford PJ, Shlyakhter D, Mason VS and Harding MW (1997) Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* **8**:141-55.
- Germann UA, Shlyakhter D, Mason VS, Zelle RE, Duffy JP, Galullo V, Armistead DM, Saunders JO, Boger J and Harding MW (1997) Cellular and biochemical characterization of VX-710 as a chemosensitizer: reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro. *Anticancer Drugs* **8**:125-40.
- Gerrard G, Payne E, Baker RJ, Jones DT, Potter M, Prentice HG, Ethell M, McCullough H, Burgess M, Mehta AB and Ganeshaguru K (2004) Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* **89**:782-90.
- Giaccone G, Linn SC, Welink J, Catimel G, Stieltjes H, van der Vijgh WJ, Eeltink C, Vermorken JB and Pinedo HM (1997) A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **3**:2005-15.
- Gill DR, Hyde SC, Higgins CF, Valverde MA, Mintenig GM and Sepulveda FV (1992) Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* **71**:23-32.
- Goasguen JE, Dossot JM, Fardel O, Le Mee F, Le Gall E, Leblay R, LePrise PY, Chaperon J and Fauchet R (1993) Expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein

- (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* **81**:2394-8.
- Godley P and Kim SW (2002) Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* **14**:280-5.
- Goldman B (2003) Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer? *J Natl Cancer Inst* **95**:255-7.
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM and et al. (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* **81**:116-24.
- Gombar VK, Polli JW, Humphreys JE, Wring SA and Serabjit-Singh CS (2004) Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure-activity relationship model. *J Pharm Sci* **93**:957-68.
- Gonzalez AG, Tincusi BM, Bazzocchi IL, Tokuda H, Nishino H, Konoshima T, Jimenez IA and Ravelo AG (2000) Anti-tumor promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). *Bioorg Med Chem* **8**:1773-8.
- Gottesman MM and Ambudkar SV (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* **33**:453-8.
- Gottesman MM, Fojo T and Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**:48-58.
- Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E and Babior BM (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:654-8.
- Green SK, Frankel A and Kerbel RS (1999) Adhesion-dependent multicellular drug resistance. *Anticancer Drug Des* **14**:153-68.
- Gupta S, Kim CH, Tsuruo T and Gollapudi S (1992) Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol* **12**:451-8.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG and Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* **5**:21-53.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hardy SP, Goodfellow HR, Valverde MA, Gill DR, Sepulveda V and Higgins CF (1995) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *Embo J* **14**:68-75.

- Hendrikse NH, Schinkel AH, de Vries EG, Fluks E, Van der Graaf WT, Willemsen AT, Vaalburg W and Franssen EJ (1998) Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *Br J Pharmacol* **124**:1413-8.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**:67-113.
- Higgins CF and Gottesman MM (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**:18-21.
- Higgins CF and Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**:918-26.
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG and Cole SP (1997) Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem* **272**:23623-30.
- Ho GT, Moodie FM and Satsangi J (2003) Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* **52**:759-66.
- Hoffman MM, Wei LY and Roepe PD (1996) Are altered pHi and membrane potential in hu MDR 1 transfectants sufficient to cause MDR protein-mediated multidrug resistance? *J Gen Physiol* **108**:295-313.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3473-8.
- Holland IB and Blight MA (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**:381-99.
- Hooijberg JH, Jansen G, Assaraf YG, Kathmann I, Pieters R, Laan AC, Veerman AJ, Kaspers GJ and Peters GJ (2004) Folate concentration dependent transport activity of the Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1). *Biochem Pharmacol* **67**:1541-8.
- Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I and Gottesman MM (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* **38**:13887-99.
- Hu Z, Jin S and Scotto KW (2000) Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem* **275**:2979-85.

- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF and Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**:703-7.
- Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P and Grand-Perret T (1993) In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res* **53**:4595-602.
- Ifergan I, Shafran A, Jansen G, Hooijberg JH, Scheffer GL and Assaraf YG (2004) Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression. A role for BCRP in cellular folate homeostasis. *J Biol Chem* **279**:25527-34.
- Igney FH and Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**:277-88.
- Ince TA and Scotto KW (1996) Stable transfection of the P-glycoprotein promoter reproduces the endogenous overexpression phenotype: the role of MED-1. *Cancer Res* **56**:2021-4.
- Ishikawa T and Ali-Osman F (1993) Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* **268**:20116-25.
- Jain RK (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* **46**:149-68.
- Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **7**:987-9.
- Jansen WJ, Kofschoten GM, Erkelens CA, Van Ark-Otte J, Pinedo HM and Boven E (1997) Anti-tumor activity of CPT-11 in experimental human ovarian cancer and human soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer* **73**:891-6.
- Jin S, Gorfajn B, Faircloth G and Scotto KW (2000) Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6775-9.
- Johnson RA, Ince TA and Scotto KW (2001) Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem* **276**:27716-20.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV and Leichman L (1995) Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* **55**:1407-12.

- Johnstone RW, Cretney E and Smyth MJ (1999) P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* **93**:1075-85.
- Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-62.
- Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T and Sugimoto Y (2002) Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* **97**:626-30.
- Kao CH, Tsai SC, Wang JJ, Ho YJ, Ho ST and Changlai SP (2001) Evaluation of chemotherapy response using technetium-99m-sestamibi scintigraphy in untreated adult malignant lymphomas and comparison with other prognosis factors: a preliminary report. *Int J Cancer* **95**:228-31.
- Kartner N, Riordan JR and Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **221**:1285-8.
- Kaufmann SH and Vaux DL (2003) Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* **22**:7414-30.
- Kennedy ML, Cortes-Selva F, Perez-Victoria JM, Jimenez IA, Gonzalez AG, Munoz OM, Gamarro F, Castanys S and Ravelo AG (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **44**:4668-76.
- Kim R (2005) Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **103**:1551-60.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR (2001) Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* **70**:189-99.
- Kim SH, Lee SH, Kwak NH, Kang CD and Chung BS (1996) Effect of the activated Raf protein kinase on the human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter. *Cancer Lett* **98**:199-205.
- Kioka N, Tsubota J, Takehi Y, Komano T, Gottesman MM, Pastan I and Ueda K (1989) P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **162**:224-31.
- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM and Dalton WS (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* **83**:2451-8.

- Klohs WD, Steinkampf RW, Havlick MJ and Jackson RC (1986) Resistance to anthracyclines and anthrapyrazoles in multidrug-resistant P388 murine leukemia cells: reversal by calcium blockers and calmodulin antagonists. *Cancer Res* **46**:4352-6.
- Klopman G, Shi LM and Ramu A (1997) Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. *Mol Pharmacol* **52**:323-34.
- Kolesnick RN and Kronke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**:643-65.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F and Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**:3537-47.
- Krishna R and Mayer LD (2000) Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* **11**:265-83.
- Kruijtzter CM, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M, Jewell RC, Paul EM and Schellens JH (2002) Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* **20**:2943-50.
- Kupchan SM, Komoda Y, Court WA, Thomas GJ, Smith RM, Karim A, Gilmore CJ, Haltiwanger RC and Bryan RF (1972) Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J Am Chem Soc* **94**:1354-6.
- Kusaba H, Nakayama M, Harada T, Nomoto M, Kohno K, Kuwano M and Wada M (1999) Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Eur J Biochem* **262**:924-32.
- Lage H (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **22**:188-99.
- Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T and Umbenhauer DR (1998) Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol* **12**:457-63.
- Le LH, Moore MJ, Siu LL, Oza AM, MacLean M, Fisher B, Chaudhary A, de Alwis DP, Slapak C and Seymour L (2005) Phase I study of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar administered in combination with vinorelbine in patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**:154-60.

- Lee CG, Ramachandra M, Jeang KT, Martin MA, Pastan I and Gottesman MM (2000) Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter. *Faseb J* **14**:516-22.
- Lee JY, Urbatsch IL, Senior AE and Wilkens S (2002) Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem* **277**:40125-31.
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR and Willman CL (1999) Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* **94**:1086-99.
- Leonard GD, Fojo T and Bates SE (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**:411-24.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:216-37.
- Linton KJ and Higgins CF (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**:5-13.
- Litman T, Druley TE, Stein WD and Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* **58**:931-59.
- Liu YY, Han TY, Giuliano AE and Cabot MC (2001) Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J* **15**:719-30.
- Locher KP, Lee AT and Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-8.
- Loe DW, Deeley RG and Cole SP (1998) Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* **58**:5130-6.
- Longley DB and Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* **205**:275-92.
- Loo TW and Clarke DM (1999) Merck Frosst Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Cell Biol* **77**:11-23.
- Loo TW and Clarke DM (2000) Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein is blocked by disulfide cross-linking between the nucleotide-binding sites. *J Biol Chem* **275**:19435-8.

- Loo TW and Clarke DM (2000) Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem* **275**:39272-8.
- Loo TW and Clarke DM (2000) The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J Biol Chem* **275**:5253-6.
- Loo TW and Clarke DM (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem* **276**:36877-80.
- Loo TW and Clarke DM (2002) Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* **277**:44332-8.
- Loo TW and Clarke DM (2005) Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem Biophys Res Commun* **329**:419-22.
- Lorenz E, Alekseev AE, Krapivinsky GB, Carrasco AJ, Clapham DE and Terzic A (1998) Evidence for direct physical association between a K⁺ channel (Kir6.2) and an ATP-binding cassette protein (SUR1) which affects cellular distribution and kinetic behavior of an ATP-sensitive K⁺ channel. *Mol Cell Biol* **18**:1652-9.
- Lowe SW, Cepero E and Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**:307-15.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**:957-67.
- Lugo MR and Sharom FJ (2005) Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. *Biochemistry* **44**:643-55.
- Luker GD, Nilsson KR, Covey DF and Piwnicka-Worms D (1999) Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J Biol Chem* **274**:6979-91.
- Lum BL and Gosland MP (1995) MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**:319-36.
- Luo G, Guenthner T, Gan LS and Humphreys WG (2004) CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr Drug Metab* **5**:483-505.
- MacFarland A, Abramovich DR, Ewen SW and Pearson CK (1994) Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. *Histochem J* **26**:417-23.

- Malingre MM, Beijnen JH, Rosing H, Koopman FJ, Jewell RC, Paul EM, Ten Bokkel Huinink WW and Schellens JH (2001) Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients. *Br J Cancer* **84**:42-7.
- Malingre MM, Terwogt JM, Beijnen JH, Rosing H, Koopman FJ, van Tellingen O, Duchin K, Huinink WW, Swart M, Lieverst J and Schellens JH (2000) Phase I and pharmacokinetic study of oral paclitaxel. *J Clin Oncol* **18**:2468-75.
- Manciu L, Chang XB, Buysse F, Hou YX, Gustot A, Riordan JR and Ruyschaert JM (2003) Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* **278**:3347-56.
- Marthinet E, Divita G, Bernaud J, Rigal D and Baggetto LG (2000) Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. *Gene Ther* **7**:1224-33.
- Martin C, Berridge G, Higgins CF and Callaghan R (1997) The multi-drug resistance reversal agent SR33557 and modulation of vinca alkaloid binding to P-glycoprotein by an allosteric interaction. *Br J Pharmacol* **122**:765-71.
- Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P and Callaghan R (2000) Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **58**:624-32.
- Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P and Callaghan R (1999) The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* **128**:403-11.
- Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J, Borst P and Schinkel AH (1996) Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* **119**:1038-44.
- Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J, Borst P and Schinkel AH (1996) Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* **119**:1038-44.
- Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, Beijnen JH, Borst P and Schinkel AH (1997) Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833. *J Clin Invest* **100**:2430-6.
- McClellan S, Whelan RD, Hosking LK, Hodges GM, Thompson FH, Meyers MB, Schuurhuis GJ and Hill BT (1993) Characterization of the P-glycoprotein over-expressing drug

- resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their in-vitro exposure to fractionated X-irradiation. *Biochim Biophys Acta* **1177**:117-26.
- McCoy C, McGee SB and Cornwell MM (1999) The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. *Cell Growth Differ* **10**:377-86.
- McCoy C, Smith DE and Cornwell MM (1995) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the MDR1 promoter is mediated by EGR1. *Mol Cell Biol* **15**:6100-8.
- McRae MP, Brouwer KL and Kashuba AD (2003) Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* **35**:19-33.
- Meerum Terwogt JM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H and Schellens JH (1998) Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet* **352**:285.
- Minderman H, O'Loughlin KL, Pendyala L and Baer MR (2004) VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin Cancer Res* **10**:1826-34.
- Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D and Charlton P (2001) In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res* **61**:749-58.
- Miyazaki M, Kohno K, Uchiumi T, Tanimura H, Matsuo K, Nasu M and Kuwano M (1992) Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:677-84.
- Mourez M, Hofnung M and Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo J* **16**:3066-77.
- Mueller-Klieser W (2000) Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* **36**:123-39.
- Munoz-Martinez F, Lu P, Cortes-Selva F, Perez-Victoria JM, Jimenez IA, Ravelo AG, Sharom FJ, Gamarro F and Castanys S (2004) Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance. *Cancer Res* **64**:7130-8.
- Murren JR (2002) Modulating multidrug resistance: can we target this therapy? *Clin Cancer Res* **8**:633-5.

- Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T and Ueda K (2000) Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* **275**:17626-30.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-65.
- Nakanishi T, Doyle LA, Hassel B, Wei Y, Bauer KS, Wu S, Pumpkin DW, Fang HB and Ross DD (2003) Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Mol Pharmacol* **64**:1452-62.
- Nebert DW and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**:1155-62.
- Newman MJ, Rodarte JC, Benbatoul KD, Romano SJ, Zhang C, Krane S, Moran EJ, Uyeda RT, Dixon R, Guns ES and Mayer LD (2000) Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* **60**:2964-72.
- Niehans GA, Jaszcz W, Brunetto V, Perri RT, Gajl-Peczalska K, Wick MR, Tsuruo T and Bloomfield CD (1992) Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphomas. *Cancer Res* **52**:3768-75.
- Obmolova G, Ban C, Hsieh P and Yang W (2000) Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* **407**:703-10.
- Ogretmen B and Safa AR (2000) Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line. *Biochemistry* **39**:194-204.
- Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, Bougaran J, Validire P, Thiounn N, Poupon MF, Fourme E and Chevillard S (2002) Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome. *Anticancer Res* **22**:121-8.
- Pajeva IK and Wiese M (2002) Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis). *J Med Chem* **45**:5671-86.
- Pallis M and Russell N (2000) P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood* **95**:2897-904.

- Panwala CM, Jones JC and Viney JL (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* **161**:5733-44.
- Pascaud C, Garrigos M and Orłowski S (1998) Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochem J* **333 (Pt 2)**:351-8.
- Paulsen IT, Brown MH and Skurray RA (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**:575-608.
- Pietenpol JA and Stewart ZA (2002) Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* **181-182**:475-81.
- Planting AS, Sonneveld P, van der Gaast A, Sparreboom A, van der Burg ME, Luyten GP, de Leeuw K, de Boer-Dennert M, Wissel PS, Jewell RC, Paul EM, Purvis NB, Jr. and Verweij J (2005) A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **55**:91-9.
- Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, McKee TD, Gohongi T, di Tomaso E, Brown EB, Izumi Y, Campbell RB, Berk DA and Jain RK (2001) Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4628-33.
- Polgar O and Bates SE (2005) ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance? *Biochem Soc Trans* **33**:241-5.
- Putman M, van Veen HW and Konings WN (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:672-93.
- Qu Q, Russell PL and Sharom FJ (2003) Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle. *Biochemistry* **42**:1170-7.
- Qu Q and Sharom FJ (2001) FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated. *Biochemistry* **40**:1413-22.
- Qu Q and Sharom FJ (2002) Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry* **41**:4744-52.
- Rago RP, Einstein A, Jr., Lush R, Beer TM, Ko YJ, Henner WD, Bublely G, Merica EA, Garg V, Ette E, Harding MW and Dalton WS (2003) Safety and efficacy of the MDR inhibitor Incel (biricodar, VX-710) in combination with mitoxantrone and prednisone in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**:297-305.

- Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycyna CA, Dey S, Gottesman MM and Pastan I (1998) Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* **37**:5010-9.
- Ramu A, Spanier R, Rahamimoff H and Fuks Z (1984) Restoration of doxorubicin responsiveness in doxorubicin-resistant P388 murine leukaemia cells. *Br J Cancer* **50**:501-7.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM and Muller WA (1998) A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6924-9.
- Regev R, Assaraf YG and Eytan GD (1999) Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur J Biochem* **259**:18-24.
- Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL and Muller M (1999) ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol* **126**:681-8.
- Robert J and Jarry C (2003) Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* **46**:4805-17.
- Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, Poruchynsky MS and Bates SE (2003) Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* **89**:1971-8.
- Robinson LJ, Roberts WK, Ling TT, Lamming D, Sternberg SS and Roepe PD (1997) Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry* **36**:11169-78.
- Roe M, Folkes A, Ashworth P, Brumwell J, Chima L, Hunjan S, Pretswell I, Dangerfield W, Ryder H and Charlton P (1999) Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **9**:595-600.
- Romsicki Y and Sharom FJ (2001) Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* **40**:6937-47.
- Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM and Pastan I (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:4538-42.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF and Ford RC (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major

- conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* **278**:8294-9.
- Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG and Cole SP (2001) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem* **276**:16076-82.
- Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, Callaghan R, Schmidlin A, Wooding C, Linton KJ and Higgins CF (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J* **20**:5615-25.
- Rowinsky EK, Smith L, Wang YM, Chaturvedi P, Villalona M, Campbell E, Aylesworth C, Eckhardt SG, Hammond L, Kraynak M, Drengler R, Stephenson J, Jr., Harding MW and Von Hoff DD (1998) Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP. *J Clin Oncol* **16**:2964-76.
- Rubin EH, de Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Lin Y, Musanti R, Grospe SL, Smith SL, Toppmeyer DL, Much J, Kane M, Chaudhary A, Jordan C, Burgess M and Slapak CA (2002) A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:3710-7.
- Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, Smyth MJ and Johnstone RW (2002) P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation. *Cell Death Differ* **9**:1266-72.
- Ruetz S and Gros P (1994) Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell* **77**:1071-81.
- Safa AR (2004) Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **4**:1-17.
- Saier MH, Jr., Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA and Nikaido H (1998) Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *Faseb J* **12**:265-74.
- Sakaeda T, Nakamura T and Okumura K (2002) MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull* **25**:1391-400.
- Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Chaudhary A, Fife K, Battiato L, Sweeney C, Jordan C, Burgess M and Slapak CA (2004) A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered

- intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* **10**:3265-72.
- Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K and Varadi A (2004) ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **567**:116-20.
- Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* **432**:294-7.
- Scala S, Akhmed N, Rao US, Paull K, Lan LB, Dickstein B, Lee JS, Elgemeie GH, Stein WD and Bates SE (1997) P-glycoprotein substrates and antagonists cluster into two distinct groups. *Mol Pharmacol* **51**:1024-33.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE and Borst P (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:4028-33.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA and van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* **97**:2517-24.
- Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB and Stubbs MT (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* **330**:333-42.
- Schuetz EG, Umbenhauer DR, Yasuda K, Brimer C, Nguyen L, Relling MV, Schuetz JD and Schinkel AH (2000) Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more mdr1 genes. *Mol Pharmacol* **57**:188-97.
- Scotto KW (2003) Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* **22**:7496-511.
- Seelig A (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **251**:252-61.
- Seelig A and Landwojtowicz E (2000) Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur J Pharm Sci* **12**:31-40.
- Sehested M, Jensen PB, Skovsgaard T, Bindslev N, Demant EJ, Friche E and Vindelov L (1989) Inhibition of vincristine binding to plasma membrane vesicles from daunorubicin-resistant Ehrlich ascites cells by multidrug resistance modulators. *Br J Cancer* **60**:809-14.
- Seiden MV, Swenerton KD, Matulonis U, Campos S, Rose P, Batist G, Ette E, Garg V, Fuller A, Harding MW and Charpentier D (2002) A phase II study of the MDR inhibitor biricodar (INCEL, VX-710) and paclitaxel in women with advanced ovarian cancer refractory to paclitaxel therapy. *Gynecol Oncol* **86**:302-10.

- Senior AE, al-Shawi MK and Urbatsch IL (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett* **377**:285-9.
- Shabbits JA, Hu Y and Mayer LD (2003) Tumor chemosensitization strategies based on apoptosis manipulations. *Mol Cancer Ther* **2**:805-13.
- Shabbits JA and Mayer LD (2002) P-glycoprotein modulates ceramide-mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin-binding anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* **1**:205-13.
- Shain KH and Dalton WS (2001) Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther* **1**:69-78.
- Shapiro AB, Fox K, Lam P and Ling V (1999) Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* **259**:841-50.
- Shapiro AB and Ling V (1997) Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **250**:122-9.
- Shapiro AB and Ling V (1997) Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* **250**:130-7.
- Shapiro AB and Ling V (1997) Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* **250**:130-7.
- Shapiro AB and Ling V (1998) Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **254**:189-93.
- Sharma RC, Inoue S, Roitelman J, Schimke RT and Simoni RD (1992) Peptide transport by the multidrug resistance pump. *J Biol Chem* **267**:5731-4.
- Shen D, Pastan I and Gottesman MM (1998) Cross-resistance to methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins. *Cancer Res* **58**:268-75.
- Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I and Gottesman MM (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. *Science* **232**:643-5.
- Shepard RL, Cao J, Starling JJ and Dantzig AH (2003) Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int J Cancer* **103**:121-5.
- Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Wetzell MW and Gupta S (1986) Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma. *Br J Cancer* **54**:235-8.

- Slotte JP and Bierman EL (1988) Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J* **250**:653-8.
- Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR and Schinkel AH (1999) Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* **104**:1441-7.
- Smit JW, Schinkel AH, Muller M, Weert B and Meijer DK (1998) Contribution of the murine mdr1a P-glycoprotein to hepatobiliary and intestinal elimination of cationic drugs as measured in mice with an mdr1a gene disruption. *Hepatology* **27**:1056-63.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ and Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**:139-49.
- Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR and Johnstone RW (1998) The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7024-9.
- Smyth MJ and Trapani JA (1995) Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* **16**:202-6.
- Sparreboom A, Planting AS, Jewell RC, van der Burg ME, van der Gaast A, de Bruijn P, Loos WJ, Nooter K, Chandler LH, Paul EM, Wissel PS and Verweij J (1999) Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in combination with GF120918, a potent inhibitor of MDR1 P-glycoprotein. *Anticancer Drugs* **10**:719-28.
- Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH and van Tellingen O (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2031-5.
- Spivey AC, Weston M and Woodhead S (2002) Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem Soc Rev* **31**:43-59.
- Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S and Mori S (1988) Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* **48**:1926-9.
- Sun H, Dai H, Shaik N and Elmquist WF (2003) Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:83-105.
- Synold TW, Dussault I and Forman BM (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* **7**:584-90.

- Szabo K, Welker E, Bakos, Muller M, Roninson I, Varadi A and Sarkadi B (1998) Drug-stimulated nucleotide trapping in the human multidrug transporter MDR1. Cooperation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem* **273**:10132-8.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S and Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* **56**:4124-9.
- te Boekhorst PA, van Kapel J, Schoester M and Sonneveld P (1992) Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**:238-42.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7735-8.
- Thomas H and Coley HM (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **10**:159-65.
- Thottassery JV, Zambetti GP, Arimori K, Schuetz EG and Schuetz JD (1997) p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11037-42.
- Tomblin G, Bartholomew L, Gimi K, Tyndall GA and Senior AE (2004) Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis. *J Biol Chem* **279**:5363-73.
- Toppmeyer D, Seidman AD, Pollak M, Russell C, Tkaczuk K, Verma S, Overmoyer B, Garg V, Ette E, Harding MW and Demetri GD (2002) Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel. *Clin Cancer Res* **8**:670-8.
- Traycoff CM, Orazi A, Ladd AC, Rice S, McMahl J and Srour EF (1998) Proliferation-induced decline of primitive hematopoietic progenitor cell activity is coupled with an increase in apoptosis of ex vivo expanded CD34+ cells. *Exp Hematol* **26**:53-62.
- Tsuruo T, Iida H, Naganuma K, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1983) Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines inherently resistant to the drug. *Cancer Res* **43**:808-13.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **41**:1967-72.

- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1982) Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* **42**:4730-3.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1983) Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* **43**:2267-72.
- Turzanski J, Grundy M, Shang S, Russell N and Pallis M (2005) P-glycoprotein is implicated in the inhibition of ceramide-induced apoptosis in TF-1 acute myeloid leukemia cells by modulation of the glucosylceramide synthase pathway. *Exp Hematol* **33**:62-72.
- Urbatsch IL, Tyndall GA, Tomblin G and Senior AE (2003) P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J Biol Chem* **278**:23171-9.
- Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC and Higgins CF (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* **355**:830-3.
- van Asperen J, van Tellingen O, Sparreboom A, Schinkel AH, Borst P, Nooijen WJ and Beijnen JH (1997) Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *Br J Cancer* **76**:1181-3.
- Van Bambeke F, Balzi E and Tulkens PM (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **60**:457-70.
- van de Waterbeemd H and Gifford E (2003) ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* **2**:192-204.
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P and van Meer G (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**:507-17.
- van Kalken C, Giaccone G, van der Valk P, Kuiper CM, Hadisaputro MM, Bosma SA, Scheper RJ, Meijer CJ and Pinedo HM (1992) Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus. *Am J Pathol* **141**:1063-72.
- van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN and Higgins CF (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **391**:291-5.
- van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJ and Konings WN (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10668-72.
- van Zuylen L, Sparreboom A, van der Gaast A, van der Burg ME, van Beurden V, Bol CJ, Woestenborghs R, Palmer PA and Verweij J (2000) The orally administered P-

- glycoprotein inhibitor R101933 does not alter the plasma pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* **6**:1365-71.
- Vanoye CG, Castro AF, Pourcher T, Reuss L and Altenberg GA (1999) Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA and PKC modulates swelling-activated Cl⁻ currents. *Am J Physiol* **276**:C370-8.
- Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS and Panchagnula R (2003) P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* **48**:347-59.
- Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF and Powis SJ (2001) Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis. *J Biol Chem* **276**:46054-63.
- Venter H, Shilling RA, Velamakanni S, Balakrishnan L and Van Veen HW (2003) An ABC transporter with a secondary-active multidrug translocator domain. *Nature* **426**:866-70.
- Vilaboa NE, Galan A, Troyano A, de Blas E and Aller P (2000) Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J Biol Chem* **275**:24970-6.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ and Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**:945-51.
- Wandel C, Kim RB, Kajiji S, Guengerich P, Wilkinson GR and Wood AJ (1999) P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res* **59**:3944-8.
- Wang YH, Li Y, Yang SL and Yang L (2005) Classification of substrates and inhibitors of P-glycoprotein using unsupervised machine learning approach. *J Chem Inf Model* **45**:750-7.
- Weisburg JH, Roepe PD, Dzekunov S and Scheinberg DA (1999) Intracellular pH and multidrug resistance regulate complement-mediated cytotoxicity of nucleated human cells. *J Biol Chem* **274**:10877-88.
- Wiese M and Pajeva IK (2001) Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr Med Chem* **8**:685-713.
- Williams DA (1993) Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? *Blood* **81**:3169-72.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**:1326-31.

- Xu C, Li CY and Kong AN (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**:249-68.
- Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, Ochiai A and Hirohashi S (2000) Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* **60**:4761-6.
- Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K and Sugimachi K (2002) Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* **74**:571-2.
- Yang H, Taylor KD and Rotter JI (2001) Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab* **74**:1-21.
- Yuen AR and Sikic BI (1994) Multidrug resistance in lymphomas. *J Clin Oncol* **12**:2453-9.
- Zastawny RL, Salvino R, Chen J, Benchimol S and Ling V (1993) The core promoter region of the P-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53. *Oncogene* **8**:1529-35.
- Zhou DC, Marie JP, Maisonneuve L, Faussat-Suberville AM and Zittoun R (1993) Effect of differentiating agents on modulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant hematopoietic HL60/DNR cell line. *Exp Hematol* **21**:779-84.
- Zhou Z, White KA, Polissi A, Georgopoulos C and Raetz CR (1998) Function of Escherichia coli MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem* **273**:12466-75.
- Zimmermann KC, Bonzon C and Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**:57-70.