

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502433

(P2004-502433A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 Q 1/02
 G O 1 N 21/77
 G O 1 N 21/78
 //(C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 R 1:91)

F I

C 1 2 Q 1/02
 G O 1 N 21/77
 G O 1 N 21/78
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 R 1:91

テーマコード (参考)

2 G O 5 4
 4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2002-508078 (P2002-508078)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月3日 (2001.7.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月6日 (2003.1.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/HU2001/000074
 (87) 国際公開番号 W02002/003066
 (87) 国際公開日 平成14年1月10日 (2002.1.10)
 (31) 優先権主張番号 P0002557
 (32) 優先日 平成12年7月3日 (2000.7.3)
 (33) 優先権主張国 ハンガリー (HU)

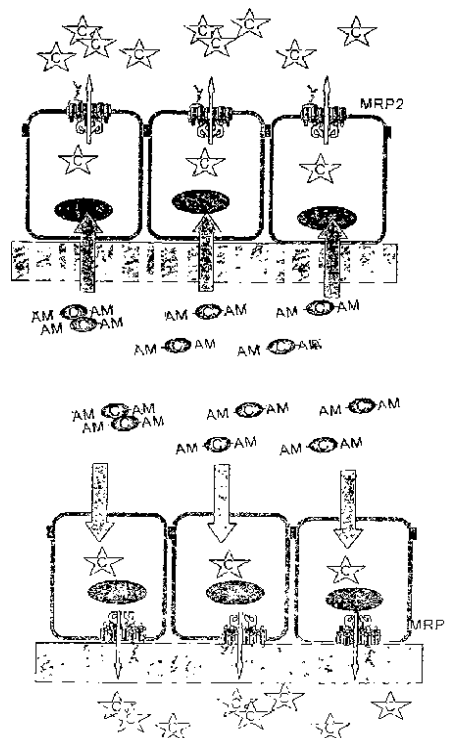
(71) 出願人 503015020
 ソルヴォ バイオテクノロジー
 ハンガリー ハー 6 7 2 2 ツェグド
 ベケ ウー 5/アー
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一
 (74) 代理人 100074228
 弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 興味のある輸送タンパク質の活性を測定する簡易な定量蛍光アッセイ方法

(57) 【要約】

本発明は、輸送タンパク質、特に多種薬物抵抗性関連タンパク質 (MRP) の活性を測定する簡易な定量的蛍光アッセイ方法に関する。本発明の方法は、透過性支持体上に集密して生育した興味ある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入培養物で行われ、前記集密細胞培養物は、ウェルの分離した頂端と側底部の区画を形成する。細胞を、一区画の蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体 (例えばカルセインAM) と接触させ、一定時間のインキュベーション後、反対側の区画から採取したサンプルで検出された蛍光強度によって、細胞で発現された興味ある輸送タンパク質の活性が示される。また、本発明は、興味ある輸送タンパク質の抑制因子及び活性化因子を定性及び定量的に測定する方法、及び分極した細胞における興味ある形質膜結合輸送タンパク質の側底部及び／又は頂端の局在性を評価する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分極した細胞の側底部又は頂端の形質膜のいずれかに局在する、興味のある輸送タンパク質の活性及び／又は量を測定する方法であって、以下の工程、

(a) 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

(b) 前記区画の一つに、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記区画の一つが、前記興味のある輸送タンパク質が局在する前記分極した細胞の形質膜の反対側であり、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、 10

(c) 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

(d) 前記非蛍光誘導体が添加される一つの区画の反対側の区画から採取されたサンプルの蛍光強度を測定する工程であって、前記強度が、前記興味のある輸送タンパク質の存在及び活性を示す工程、及び任意に、

(e) 工程(d)で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質の活性及び／又は量の測定を計算する工程、
を含むことを特徴とする、方法。 20

【請求項 2】

分極した細胞の側底部又は頂端の形質膜のいずれかに局在する興味のある輸送タンパク質の活性を抑制又は向上させる、興味のあるテスト化合物の能力を測定する方法であって、以下の工程、

(a) 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

(b) 前記区画の一つに、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記区画の一つが、前記興味のある輸送タンパク質が局在する前記分極した細胞の形質膜の反対側であり、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、 30

(c) 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

(d) 前記非蛍光誘導体が添加される区画の反対側の区画から採取されたサンプルの蛍光強度を測定する工程であって、前記強度が、前記興味のある輸送タンパク質の存在及び活性を示す工程、及び任意に、

(e) 工程(d)で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質の活性の測定を計算する工程、

(f) 工程(a)で供給された同一の分極した細胞培養物又はそれと本質的に同一の分極した細胞培養物を使用して、工程(b)－(e)を繰り返し、一方、前記興味のあるテスト化合物又は前記細胞内で前記興味のあるテスト化合物から生成された興味のある代謝生成物を、繰り返し行われる工程(c)における前記興味のある輸送タンパク質と接触させることを確実にする工程、及び 40

(g) 工程(d)及び繰り返し行われた工程(d)で測定された蛍光強度の値を比較する工程、及び／又は工程(e)及び繰り返し行われた工程(e)で計算された活性値を比較する工程、及び前記興味のあるテスト化合物が、前記興味のある輸送タンパク質の活性を抑制又は向上させるかどうかを判定する工程、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 3】

分極した細胞において興味のある形質膜結合輸送タンパク質の側底部及び／又は頂端の局在性を評価する方法であって、以下の工程、

(a) 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

(b) 前記頂端及び側底部の区画の両方に、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、

(c) 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

(d) 両方の区画から採取したサンプルの蛍光強度を測定する工程、

(e) 異なる区画で測定された蛍光強度の値を比較する工程であって、前記比較が、前記興味のある輸送タンパク質の頂端及び／又は側底部の局在を示す工程、及び任意に、

(f) 工程(d)で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質のパーセントの頂端及び／又は側底部の局在を計算する工程、を含むことを特徴とする、方法。

【請求項4】

前記蛍光化合物が、カルセインであって、かつ前記蛍光化合物の非蛍光誘導体が、カルセインの細胞透過性非蛍光誘導体、有利にはカルセインAMである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

前記分極した細胞が、腎臓細胞であって、有利にはMDCK II細胞である、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

前記工程(c)のインキュベーションが、約37℃で約30分間行われる、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

前記興味のある輸送タンパク質が、ABC輸送体スーパーファミリーのメンバーである、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

前記興味のある輸送タンパク質が、多種薬物輸送体又は多種薬物輸送体関連タンパク質である、請求項7記載の方法。

【請求項9】

前記興味のある輸送タンパク質が、MRP1又はMPRである、請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、興味のある輸送タンパク質、特に、多種薬物抵抗性関連タンパク質(MRP)の活性を測定する、簡易な定量的蛍光アッセイに関する。

本発明の方法は、透過性支持体上に集密して(confuency)生育した興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入培養物で行われ、前記集密細胞培養物は、ウェルの分離した頂端(apical)の及び側底部(basolateral)の区画を形成する。細胞を、一区画の蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体(例えば、カルセインAM)と接触させ、一定時間のインキュベーション後、反対側の区画から採取されたサンプルで検出された蛍光強度によって、細胞に発現した興味のある輸送タンパク質の活性が示される。

また、本発明は、興味のある輸送タンパク質の抑制因子及び活性化因子の定性及び定量的測定方法、及び分極した細胞の興味のある形質膜結合輸送タンパク質の側底部及び／又は頂端の局在性を評価する方法に関する。

10

20

30

40

50

【0002】

【発明の背景】

多種薬物抵抗性タンパク質（MDR）及び多種薬物抵抗性関連タンパク質、即ちMRP1及びMRP2は、ABC輸送体スーパーファミリーのメンバーであり、悪性腫瘍に多種薬物抵抗性を生じさせることができる。今までに、少なくとも6種類のMRP様タンパク質が同定されている。これらのタンパク質の生理学的役割は、毒剤の排除から多様な分泌機能の範囲に渡るであろう。MRP1は、様々な組織に広く発現され、一方MRP2は、肝細胞及び腎臓の近位尿細管の上皮細胞に優勢に発現する。従って、このような輸送タンパク質を効果的に抑制する新規化合物の同定は、主要な関心事であり、薬物抵抗性タイプの悪性疾患に対してより効果的な化学療法的治療方法を作り上げようと試みられている。また、前記輸送タンパク質の活性化因子の同定は、それらの活性の向上が幾つかの望ましくない生理学的状態の除去を助けるであろうという他の適用に興味をもたれているかもしれない。

MRP1は、マイナスにチャージした蛍光化合物、例えば、カルセイン遊離酸を、細胞から追い出すことが以前から明らかにされている（Fellerら、FEBS Lett. 368、385-388（1995）；Holloら、FEBS Lett. 383、99-104（1996））。我々は、この色素は、MRP2によっても細胞から迅速に排出されることを近頃発見した。また、このタンパク質ファミリーの他のメンバーがこの化合物を輸送することも可能である。分極した細胞での、これらのタンパク質の分布は、均一ではない。MRP1の発現は、側底部表面に限定され、一方MRP2は、頂端膜に唯一発現される。

この特徴により、透過性の固体支持体（例えば、多孔性膜）上で生育した分極した細胞の集密培養物で行われる、いわゆる有向（vectorial）輸送アッセイにおいて、これら及び他の同様なタンパク質の機能の評価が可能となる。従来説明されていた有向輸送アッセイ（Evers, Rら、J. Clin. Invest. 97、1211-1218（1996））は、MRP1及びMRP2のような輸送タンパク質の局在性と活性を実験的に調査するのに好適であると考えられるが、検出のためにもっぱら放射性標識された基質を使用する一連の欠点を持ち、当然、特別の実験室安全装置及び規制の適用が必要となる。別の欠点は、前述の有向輸送アッセイでは、興味のある細胞内輸送タンパク質の活性を評価するのに使用される一定の標識基質が、使用される集密培養物の細胞が接触している密着結合を通過するかもしれず、従って、輸送されることなく、反対側の区画に到着できるということであり、その結果、興味のある輸送タンパク質の活性の正確な測定に好適な定量的アッセイを開発するのが非常に複雑になる。

【0003】

従って、本発明の目的は、前述の方法よりもずっと簡単に行え、かつ自動化される簡易な定性及び定量的有向輸送アッセイ方法を提供することにある、また、細胞貫通放出（分極した細胞の密着結合を通り抜け、それにより、細胞による取り込み及び排出を避けるという輸送ではない）を測定するだけで定量的になされる。本発明の別の目的は、興味のある輸送タンパク質の抑制因子及び活性化因子を同定するアッセイ方法、また側底部及び／又は頂端の形質膜の興味のある輸送タンパク質の局在性を迅速にかつ簡単に評価するアッセイ方法を提供する。

カルセインは、周知の蛍光基質であり（モレキュラープロブス社、USAから市販されている）、前記化合物の非蛍光アセトキシメチルエステル誘導体（カルセインAM）は、その疎水性の性質のため、細胞透過性であることが知られる。我々は、MDR1、又は細胞からカルセインAMを追い出すことができるがカルセイン自体は追い出さない他の輸送タンパク質の活性を評価するのにカルセインAMを使用する、既に開発された異なるアッセイの組み合わせ方を持っている（米国特許第5,872,014号明細書；欧州特許第0,784,699号明細書）。我々は、カルセイン及びカルセインAM（及び同様の性質の他の化合物）を、MRP1、MRP2及び細胞からカルセインを効果的に追い出す同様の輸送タンパク質の活性を評価するアッセイ方法を作り上げるのにも使用できることを

認識している。

【0004】

【発明の実施の形態】

本発明の方法は、透過性支持体（例えば多孔性膜又はコラーゲンマトリックス）上に（形成された密着結合で）密集して生育した興味のある輸送タンパク質を発現し、それによってウェルの分離した頂端と側底部の区画を形成する、分極した細胞のウェル封入培養物で行われる。細胞培養物を、1つの区画で蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体（例えばカルセインAM）に接触させ、次にその誘導体が、細胞内に取り込まれて切断され、蛍光化合物（例えばカルセイン）が生成され、その蛍光化合物は、興味のある膜結合輸送タンパク質の基質になる。次に、反対側の区画から採取されたサンプルで検出される蛍光強度によって、細胞から前記蛍光化合物を排出する興味のある膜結合輸送タンパク質の実際の活性が示される（図1参照のこと）。コントロール実験は、MRPを発現しない同様の培養物で行うことができる。また、本発明は、興味のある輸送タンパク質の局在性、抑制因子及び／又は活性化因子の定性及び定量的測定方法に関する。ある化合物と興味のある輸送タンパク質間の相互作用を測定するために、本発明の方法は、試験される化合物の存在下で行われる。答える問題によって、調べた化合物をセル培養物の頂端又は側底部又は両側いずれかに添加することができる。

【0005】

従って、本発明は、分極した細胞の側底部又は頂端の形質膜のいずれかに局在する、興味のある輸送タンパク質の活性及び／又は量を測定する方法を提供し、以下の工程、

（a） 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

（b） 前記区画の一つに、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記区画の一つが、前記興味のある輸送タンパク質が局在する前記分極した細胞の形質膜の反対側であり、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、

（c） 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

（d） 前記非蛍光誘導体が添加される区画の反対側の区画から採取されたサンプルの蛍光強度を測定する工程であって、前記強度が、前記興味のある輸送タンパク質の存在及び活性を示す工程、及び任意に、

（e） 工程（d）で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質の活性及び／又は量の測定を計算する工程、を含む。

【0006】

また、本発明は、分極した細胞の側底部又は頂端の形質膜のいずれかに局在する興味のある輸送タンパク質の活性を抑制又は向上させる、興味のあるテスト化合物の能力を測定する方法を提供し、以下の工程、

（a） 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

（b） 前記区画の一つに、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記区画の一つが、前記興味のある輸送タンパク質が局在する前記分極した細胞の形質膜の反対側であり、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、

（c） 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

（d） 前記非蛍光誘導体が添加される区画の反対側の区画から採取されたサンプルの蛍

光強度を測定する工程であって、前記強度が、前記興味のある輸送タンパク質の存在及び活性を示す工程、及び任意に、

(e) 工程(d)で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質の活性の測定を計算する工程、

(f) 工程(a)で供給された同一の分極した細胞培養物又はそれと本質的に同一の分極した細胞培養物を使用して、工程(b)－(e)を繰り返し、一方、前記興味のあるテスト化合物又は前記細胞内で前記興味のあるテスト化合物から生成された興味のある代謝生成物を、繰り返し行われる工程(c)における前記興味のある輸送タンパク質と接触させることを確実にする工程、及び

(g) 工程(d)及び繰り返し行われた工程(d)で測定された蛍光強度の値を比較する工程、及び／又は工程(e)及び繰り返し行われた工程(e)で計算された活性値を比較する工程、及び前記興味のあるテスト化合物が、前記興味のある輸送タンパク質の活性を抑制又は向上させるかどうかを判定する工程、を含む。

【0007】

更に、本発明は、分極した細胞の興味のある形質膜結合輸送タンパク質の側底部及び／又は頂端の局在を評価する方法に関し、以下の工程、

(a) 透過性支持体上で生育した前記興味のある輸送タンパク質を発現する分極した細胞のウェル封入集密培養物を供給し、前記培養物の前記細胞間の密着結合の形成を確実にし、それによって、前記集密細胞培養物の両側面に分かれた側底部及び頂端の区画を形成する工程、

(b) 前記頂端及び側底部の区画の両方に、蛍光化合物の細胞透過性非蛍光誘導体を添加する工程であって、前記誘導体が、細胞内の酵素によって切断され得、前記興味のある輸送タンパク質の基質である蛍光化合物を形成する工程、

(c) 前記非蛍光誘導体の存在下で前記細胞をインキュベートする工程、

(d) 両方の区画から採取したサンプルの蛍光強度を測定する工程、

(e) 異なる区画で測定された蛍光強度の値を比較する工程であって、前記比較が、前記興味のある輸送タンパク質の頂端及び／又は側底部の局在を示す工程、及び任意に、

(f) 工程(d)で測定された蛍光強度の値に基づいて、かつあらかじめ確立されたキャリブレーションカーブ及び／又は経験的相関に基づいて、前記細胞に存在する前記興味のある輸送タンパク質のパーセントの頂端及び／又は側底部の局在を計算する工程、を含む。

【0008】

本発明の方法に使用される前記蛍光化合物は、カルセインが有利であり、前記蛍光化合物の非蛍光誘導体は、カルセインの細胞透過性非蛍光誘導体、有利にはカルセインAMである。

本発明の方法は、有利には、分極した腎臓細胞で、より有利には、MDCK II細胞で行い、約37℃で約30分間インキュベーションする。

本発明の幾つかの有利な態様は、以下に示す実験例によって更に説明され、また、付加したクレームによって定義される本発明の範囲について制限するものではない。

【0009】

【実施例】

例1 有向カルセイン輸送のMRP2基質の抑制効果

分極したイヌの腎臓細胞(MDCK II)及びヒトMRP2を安定して発現するMDCK II由来の培養細胞株を、トランスウェル・コル(Transwell-Cor)膜支持体(孔径4□m)に播き、培養物を、10% FBS及び抗生物質を含むD-MEM培地で7日間維持した。培養物を洗浄後、200µl及び400µlのリンガー緩衝液を上方及び下方の区画に、それぞれ添加した。細胞を、指示されたように試験した薬物で5分間、相互にプレインキュベートした。次に、細胞を、側底部側(下方のチャンバー)で、

10

20

30

40

50

5 μ l のカルセインAMに37℃で30分間暴露した。100 μ l のサンプルを、頂端の区画（上方のチャンバー）から採取し、その蛍光を測定した。図2において、左のカラムは、親細胞での結果を示し、一方右のカラムは、MRP2を発現した細胞で得られた結果を示す。黒ベタのバーは、薬物の不存在下で測定された任意の単位での蛍光を描き、白抜き及び灰色のバーは、それぞれ、25 μ Mベンズブロマロン及び1 mMプロベネシドの存在下で得られた結果を示す。

【0010】

例2 MDC K I I細胞単層によるカルセインの放出

分極した細胞をマイクロポラスポリカーボネートフィルター（孔径3 μ m、直径24.5 mm）に播き、毎日培地交換して3日間培養した。実験は、細胞層の頂端又は基底側のいずれかで培地を交換することにより開始した。カルセインの放出を、カルセインAM（1 μ M）を含むHBSSで室温で、単層をインキュベートすることによって測定した。各区画のサンプル（200 μ l）を指示した時点で採取した。800 μ l のHBSSを添加し、蛍光を測定した。放出されたカルセインの量を、遊離カルセインで作成されたキャリブレーションカーブを使って計算した。結果を図3に示す。

上に示したように、本発明の有利な態様を通じて、本発明の方法は、興味のある輸送タンパク質のようなMRPの活性の簡易な定性及び定量評価、前記輸送タンパク質の抑制因子及び活性化因子の同定、及び側底部及び／又は頂端の形質膜のこのようなタンパク質の局在性を迅速に簡単に評価するのに好適である。当業者は、前述の本発明の方法の様々な変更、改良が、ここで説明されたものに、代わりの解釈を等価に適用することによって作り上げられ、しかしながら、このような変化及び改良は、本発明の最初の精神から逸脱することなく、従って、付随するクレームによって定義される本発明の範囲内にあることを確実に理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の輸送測定アッセイのスキームである。（省略：Cは、蛍光化合物、C-AMは、Cの非蛍光誘導体である。）

【図2】

本発明のアッセイによって測定した、有向細胞貫通カルセイン輸送の2種類のMRP2基質の抑制効果を示す。

【図3】

MDC K I I細胞単層による、カルセイン放出を示す。カルセインAMを、頂端及び側底部の培地の両方に添加し、培地に現れたカルセインの量を測定した。サンプルを、1及び2時間で採取した。四角：頂端の区画に放出。丸：側底部の区画に放出。

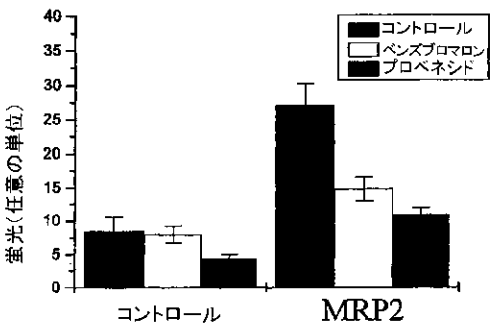
10

20

30

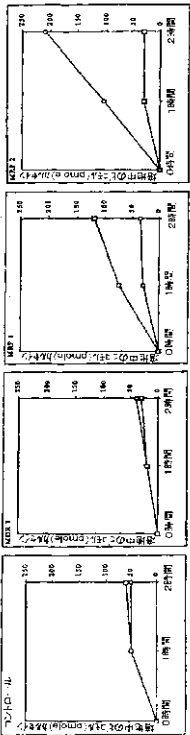
【 図 2 】

Fig. 2



【 図 3 】

Fig. 3



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/03066 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/HU/01/00074
- (22) International Filing Date: 3 July 2001 (03.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: P0002557 3 July 2000 (03.07.2000) HU
- (71) Applicant (for all designated States except US): SOIYO BIOTECHNOLOGY [HU/HU]; Bekes u. Nta. H-6722 Szeged (HU).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOMOLYA, László [HU/HU]; Krisztina krt. 28, II-1013 Budapest (HU); SARKADI, Balázs [HU/HU]; Ágnes u. 23/b, H-1121 Budapest (HU); EYERS, Raymond [DE/DE]; Künzleweg 7, 63071 Offenbach am Main (DE).
- (74) Agent: DANUBIA PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS; H-1368, Budapest 5, Pf. 198., Bajcsy-Zsibinszky út 16., H-1051 Budapest (HU).
- (81) Designated States (nationally): AE, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/03066 A2

(54) Title: SIMPLE QUANTITATIVE FLUORESCENT ASSAY METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF TRANSPORT PROTEINS OF INTEREST

(57) Abstract: The invention relates to a simple quantitative fluorescent assay method for determining the activity of transport proteins, more specifically multi-drug resistance associated proteins (MRPs). The method of the invention is performed on a well seeded culture of polarized cells expressing a transport protein of interest grown to confluency on a permeable support, said confluent cell culture forming well separated apical and basolateral compartments. The cells are contacted with a cell permeable non fluorescent derivative of a fluorescent compound (e.g., calcein AM) in one compartment and, after a certain period of incubation, the fluorescence intensity detected in a sample taken from the opposite compartment is indicative of the activity of the transport protein of interest expressed in the cells. The invention also concerns methods for the qualitative and quantitative determination of inhibitors and activators of transport proteins of interest and methods for assessing basolateral and/or apical localization of plasma membrane bound transport proteins of interest in polarized cells.

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

Simple quantitative fluorescent assay method for determining the activity of transport proteins of interest

The invention relates to a simple quantitative fluorescent assay method for determining the activity of transport proteins of interest, more specifically multi-drug resistance associated proteins (MRPs).

The method of the invention is performed on a well sealed culture of polarized cells expressing a transport protein of interest grown to confluency on a permeable support, said confluent cell culture forming well separated apical and basolateral compartments. The cells are contacted with a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound (e.g. calcein AM) in one compartment and, after a certain period of incubation, the fluorescence intensity detected in a sample taken from the opposite compartment is indicative of the activity of the transport protein of interest expressed in the cells.

The invention also concerns methods for the qualitative and quantitative determination of inhibitors and activators of transport proteins of interest and methods for assessing basolateral and/or apical localization of plasma membrane bound transport proteins of interest in polarized cells.

Background of the invention

The multi-drug resistance proteins (MDRs) and the multi-drug resistance associated proteins, MRP1 and MRP2 are members of the ABC-transporter superfamily, and may cause multiple drug resistance in malignant tumors. By now, at least six MRP-like proteins have been identified. The physiological role of these proteins may range from elimination of toxic agents to diverse secretory function, predominantly in epithelial cells. MRP1 is widely expressed in various tissues, while MRP2 is predominantly expressed in hepatocytes and epithelial cells of renal proximal tubules. Identifying novel compounds effectively inhibiting such transport proteins is, therefore, a major interest in trying to elaborate more effective chemotherapeutical treatment methods for drug resistant type of malignant disorders. Identifying activators of said transport proteins might also be of interest in other applications where the enhancement of their activity may help in the elimination of some undesired physiological states.

It has been previously shown that MRP1 extrudes negatively charged fluorescent compounds, e.g. calcein free acid, from the cells [Feller et al, FEBS Lett. 368, 385-388 (1995); Holló et al, FEBS Lett. 383, 99-104 (1996)]. We have recently found that this dye is rapidly expelled from cells also by MRP2. It is also possible that other members of this

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

protein family transport this compound. In polarized cells, the distribution of these proteins is not homogeneous. Expression of MRP1 is restricted to the basolateral surface, while MRP2 is expressed solely in the apical membrane.

This feature makes possible the assessment of the function of these and other similar proteins in the so called vectorial transport assay performed on confluent cultures of polarized cells grown on permeable solid support (e.g. on porous membranes). The vectorial transport assay described so far [Evers, R. et al, J. Clin. Invest. 27, 1211-1218 (1996)], though being suitable to experimentally investigate the localization and activity of transport proteins like MRP1 and MRP2, suffers from the serious drawback of using exclusively radioactively labeled substrates for detection which, of course, requires the application of extra laboratory safety equipment and regulations. Another drawback is the previously described vectorial transport assay is that certain labeled substrates used for the assessment of the activity of the intracellular transport proteins of interest might be able to pass the tight junctions contacting the cells of the confluent culture used and, therefore, can get to the opposite compartment even without being transported, thus making very complicated to develop a suitable quantitative assay for the exact determination of the activity of the transport proteins of interest.

It is, therefore, an object of the present invention is to provide simple qualitative and quantitative vectorial transport assay methods that are significantly easier to perform and automate than the previously described ones and can also be made quantitative by only detecting the transcellular export (and not the transport going possibly through the tight junctions of the polarized culture and thereby avoiding uptake and excretion by the cells). Another object of the present invention is to provide assay methods for the identification of inhibitors and activators of transport proteins of interest and, also, assay methods for the fast and easy assessment of the localization of transport proteins of interest in the basolateral and/or apical plasma membrane.

Calcein is a well known fluorescent substance (commercialized by Molecular Probes, Inc. USA) and the non-fluorescent acetoxymethyl ester derivative of said compound (calcein AM) is known to be cell permeable due to its hydrophobic character. We have previously developed different assay arrangements using calcein AM for the assessment of the activity of MDR1 or other transport proteins which can extrude calcein AM from the cells but can not extrude calcein itself (US Pat. No. 5,872,014; European Patent No. 0,784,699). We now have recognized that calcein and calcein AM (and other compounds of similar be-

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

havior) can also be used to elaborate assay methods for the assessment of the activity of MRP1, MRP2 and similar transport proteins which can effectively extrude calcein out from the cells.

5 **Detailed description of the invention**

The method of the invention is performed on a well sealed culture of polarized cells expressing a transport protein of interest grown to confluency (with tight junctions having been formed) on permeable supports (e.g. on porous membranes or collagen matrixes) and forming thereby well separated apical and basolateral compartments. The cell culture is
10 contacted with a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound (e.g. calcein AM) in one compartment, which derivative is then taken up by and cleaved within the cells to produce a fluorescent compound (e.g. calcein), which fluorescent compound is a substrate of the membrane bound transport protein of interest. The fluorescence intensity detected in a sample taken from the opposite compartment is then indicative of the actual
15 activity of the membrane bound transport protein of interest excreting said fluorescent compound from the cells (see Figure 1). Control experiments can be performed with similar cultures not expressing MRPs. The invention also concerns methods for the qualitative and quantitative determination of the localization, inhibitors and/or activators of transport proteins of interest. To determine the interaction between certain compounds and transport
20 proteins of interest, the method of the invention is performed in the presence of the compound to be examined. The studied compound can be added to either the apical or the basolateral or both sides of the cell culture depending on the question to be answered.

The present invention therefore provides a method for determining the activity and/or quantity of a transport protein of interest being localized either to the basolateral or to the
25 apical plasma membrane of polarized cells comprising the steps of:

- (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells supposed to express said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell
30 culture;
- (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into one of the compartments, which is opposite to the plasma membrane of said polarized cells where the transport protein of interest is localized, said derivative

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said transport protein of interest;

(c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;

5 (d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from the compartment opposite to the one where said non-fluorescent derivative was added, said intensity being indicative of the presence and activity of said transport protein of interest; and optionally

(e) calculating the measure of activity and/or quantity of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity value measured in step (d) and on calibration curves and/or empirical correlations established previously.

10 The invention also provides a method for determining the ability of a test compound of interest to inhibit or enhance the activity of a transport protein of interest being localized either to the basolateral or to the apical plasma membrane of polarized cells comprising the steps of:

15 (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells expressing said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell culture;

20 (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into one of the compartments, which is opposite to the plasma membrane of said polarized cells where the transport protein of interest is localized, said derivative being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said transport protein of interest;

25 (c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;

(d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from the compartment opposite to the one where said non-fluorescent derivative was added, said intensity being indicative of the presence and activity of said transport protein of interest; and optionally

30 (e) calculating the measure of activity of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity value measured in step (d) and calibration curves and/or empirical correlations established previously;

(f) repeating steps (b)-(e) using the same polarized cell culture provided in step (a)

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

- or a polarized cell culture essentially identical to that while ensuring that said test compound of interest or any metabolite of interest produced from said test compound of interest within said cells be contacted with said transport protein of interest in repeatedly executed step (c); and
- 5 (g) comparing the fluorescence intensity values measured in step (d) and in repeatedly executed step (d) and/or comparing the activity values calculated in step (e) and in repeatedly executed step (e) and determining whether the test compound of interest inhibits or enhances the activity of said transport protein of interest.
- 10 The invention further concerns a method for assessing basolateral and/or apical localization of a plasma membrane bound transport protein of interest in polarized cells comprising the steps of:
- (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells expressing said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of
- 15 tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell culture;
- (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into both the apical and basolateral compartments, said derivative being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said
- 20 transport protein of interest;
- (c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;
- (d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from both compartments;
- (e) comparing the fluorescence intensity values measured in the different compartment, said comparison being indicative of apical and/or basolateral localization of
- 25 said transport protein of interest; and optionally
- (f) calculating the percentage apical and/or basolateral localization of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity values measured in step (d) and calibration curves and/or empirical correlations established previously.
- 30 Said fluorescent compound used in the method of the invention is advantageously calcein and said non-fluorescent derivative of said fluorescent compound is a cell permeable non-fluorescent derivative of calcein, advantageously calcein AM.
- The method of the invention is advantageously performed on polarized kidney cells,

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

more advantageously MDCK II cells, with said incubation occurring at about 37 °C for about 30 minutes.

Brief description of the drawings

Figure 1 is the scheme of the transport measurement assay of the invention (abbreviations: C: fluorescent compound; C-AM: Non fluorescent derivative of C).

Figure 2 shows the inhibitory effect of two MRP2 substrates on the vectorial transcellular calcein transport as determined by the assay of the invention.

Figure 3 shows the export of calcein by MDCK II cell monolayers. Calcein AM was added to both the apical and basolateral medium, and the amount of calcein appearing in the medium was measured. Samples were taken at 1 and 2h. Squares: export to apical compartment. Circles: export to basolateral compartment.

Several advantageous embodiments of the invention will be further illustrated by the below-presented experimental examples which are not intended to be limiting as to the scope of the invention which, in turn, is defined by the appended claims.

Example 1

Inhibitory effect of MRP2 substrates on vectorial calcein transport

Polarized canine kidney cells (MDCK II) and its derived cell line stably expressing the human MRP 2 were seeded onto Transwell-Col membrane supports (4 $\square$ m in pore size), and the cultures were maintained for 7 days in D-MEM medium containing 10 % FBS and antibiotics. After washing the cultures, 200 μ l and 400 μ l Ringer's buffer was added to the upper and lower compartments, respectively. The cells were bilaterally pre-incubated for 5 minutes with the examined drugs as indicated. The cells were then exposed to 5 μ M calcein-AM on the basolateral side (lower chamber) for 30 minutes at 37 °C. 100 μ l sample was taken from the apical compartment (upper chamber) and its fluorescence was determined. In Figure 2, the left columns show the results with parental cells, while right columns indicate that was obtained with cells expressing MRP2. Solid bars depicts the fluorescence in arbitrary units measured in the absence of any drug, open and gray bars indicate the results obtained in the presence of 25 μ M benzothiazoluron and 1 mM probenecid, respectively.

Example 2

Export of calcein by MDCK II cell monolayers

Polarized cells were seeded on microporous polycarbonate filters (3 $\square$ m pore size, 24.5 mm diameter) and cultured for 3 days with a daily medium replacement. The experi-

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

ment was started by replacing the medium at either the apical or the basal side of the cell layer. Export of calcein was determined by incubating monolayers in HBSS containing calcein AM (1 μ M) at room temperature. Samples (200 μ l) from each compartment were taken at the time-points indicated. 800 μ l HBSS was added and fluorescence was determined. The amount of calcein exported was calculated using a calibration curve made with free calcein. Results are shown in Figure 3.

As demonstrated above via advantageous embodiments of the invention, the methods of the invention are suitable for the simple qualitative and quantitative assessment of the activity of MRP like transport proteins of interest, for the identification of inhibitors and activators of said transport proteins and for the fast and easy assessment of the localization of such proteins in the basolateral and/or apical plasma membrane. Persons skilled in the art will certainly understand that numerous variations and modification of the described methods of the invention can be elaborated by applying alternative solutions equivalent to those described herein, such variations and modifications, however, will not diverge from the original spirit of the invention and, therefore, remain within the scope of the invention as defined by the appended claims.

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

Claims:

1. A method for determining the activity and/or quantity of a transport protein of interest being localized either to the basolateral or to the apical plasma membrane of polarized cells comprising the steps of:
 - (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells supposed to express said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell culture;
 - (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into one of the compartments, which is opposite to the plasma membrane of said polarized cells where the transport protein of interest is localized, said derivative being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said transport protein of interest;
 - (c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;
 - (d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from the compartment opposite to the one where said non-fluorescent derivative was added, said intensity being indicative of the presence and activity of said transport protein of interest; and optionally
 - (e) calculating the measure of activity and/or quantity of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity value measured in step (d) and on calibration curves and/or empirical correlations established previously.
2. A method for determining the ability of a test compound of interest to inhibit or enhance the activity of a transport protein of interest being localized either to the basolateral or to the apical plasma membrane of polarized cells comprising the steps of:
 - (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells expressing said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell culture;
 - (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into one of the compartments, which is opposite to the plasma membrane of said

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

- polarized cells where the transport protein of interest is localized, said derivative being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said transport protein of interest;
- (c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;
- 5 (d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from the compartment opposite to the one where said non-fluorescent derivative was added, said intensity being indicative of the presence and activity of said transport protein of interest; and optionally
- (e) calculating the measure of activity of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity value measured in step
- 10 (d) and calibration curves and/or empirical correlations established previously;
- (f) repeating steps (b)-(e) using the same polarized cell culture provided in step (a) or a polarized cell culture essentially identical to that while ensuring that said test compound of interest or any metabolite of interest produced from said test compound of interest within said cells be contacted with said transport protein of interest
- 15 in repeatedly executed step (c); and
- (g) comparing the fluorescence intensity values measured in step (d) and in repeatedly executed step (d) and/or comparing the activity values calculated in step (e) and in repeatedly executed step (e) and determining whether the test compound of interest inhibits or enhances the activity of said transport protein of interest.
- 20 3. A method for assessing basolateral and/or apical localization of a plasma membrane bound transport protein of interest in polarized cells comprising the steps of:
- (a) providing a well sealed confluent culture of polarized cells expressing said transport protein of interest grown on a permeable support, ensuring the formation of
- 25 tight junctions among said cells of said culture, forming thereby separate basolateral and apical compartments on the opposite sides of said confluent cell culture;
- (b) adding a cell permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound into both the apical and basolateral compartments, said derivative being cleavable by intracellular enzymes to form a fluorescent compound that is a substrate of said
- 30 transport protein of interest;
- (c) incubating the cells in the presence of said non-fluorescent derivative;
- (d) measuring the fluorescence intensity of a sample taken from both compartments;
- (e) comparing the fluorescence intensity values measured in the different compart-

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

ment, said comparison being indicative of apical and/or basolateral localization of said transport protein of interest; and optionally

(f) calculating the percentage apical and/or basolateral localization of said transport protein of interest being present in said cells on the basis of the fluorescence intensity values measured in step (d) and calibration curves and/or empirical correlations established previously.

4. The method according to anyone of claims 1-3 wherein said fluorescent compound is calcein and said non-fluorescent derivative of said fluorescent compound is a cell permeable non-fluorescent derivative of calcein, advantageously calcein AM.

5. The method according to anyone of claims 1-4 wherein said polarized cells are kidney cells, advantageously MDCK II cells.

6. The method according to anyone of claims 1-5 wherein the incubation in step (c) takes place at about 37 °C for about 30 minutes.

7. The method according to anyone of claims 1-6 wherein the transport protein of interest is a member of the ABC-transporter superfamily.

8. The method according to claim 7 wherein the transport protein of interest is a multi-drug transporter or multi-drug transporter related protein.

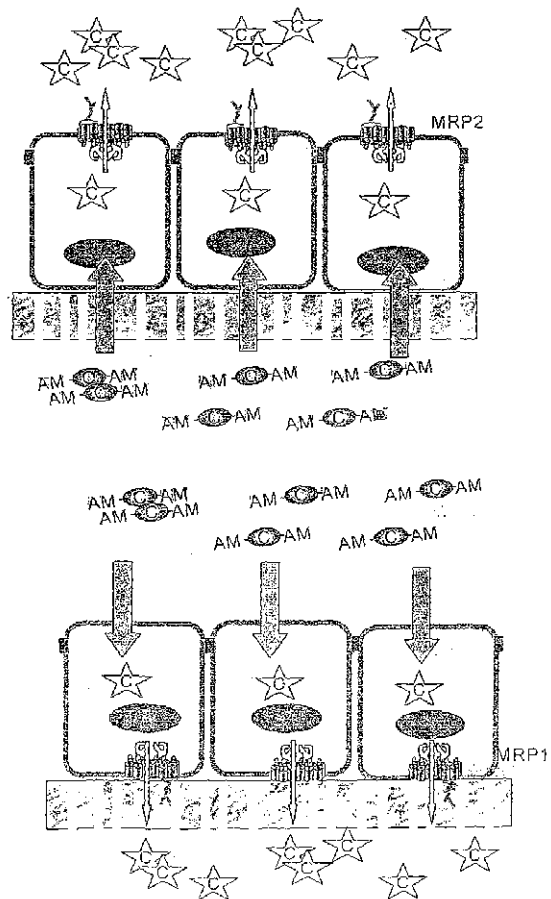
9. The method according to claim 8 wherein the transport protein of interest is MRP1 or MRP2.

WO 02/03066

PCT/HU01/00074

1/3

Fig. 1

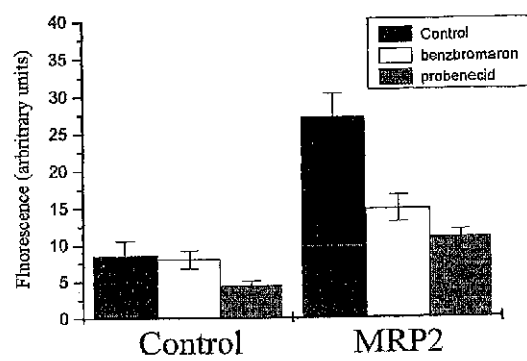


WO 02/03066

PCT/HU01/00074

2/3

Fig. 2

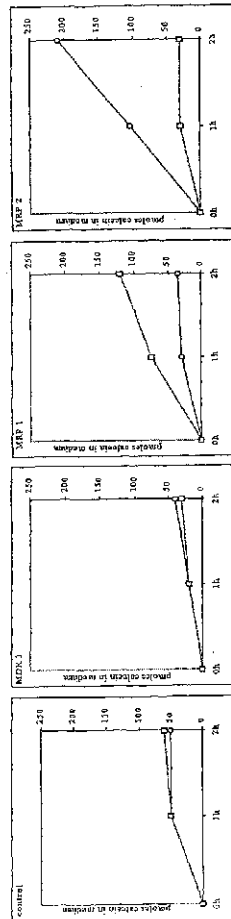


WO 02/03066

PCT/HU01/00074

3/3

Fig. 3



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/003066 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/50, 33/58

SARKADI, Balázs [HU/HU]; Ágnes u. 29/b, H-1121 Budapest (HU); EYERS, Raymond [DE/DE]; Kindberg 7, 63071 Offenbach am Main (DE).

(21) International Application Number: PCT/HU01/00074

(22) International Filing Date: 3 July 2001 (03.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 190002557 3 July 2000 (03.07.2000) HU

(71) Applicant (for all designated States except US): SOVO BIOTECHNOLOGY [HU/HU]; Béke u. 5/a, H-6722 Szécs (HU).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOMOLYA, László [HU/HU]; Krisztina krt. 28, H-1013 Budapest (HU).

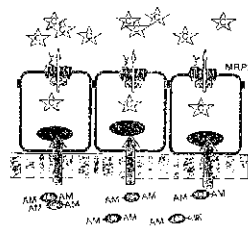
(74) Agent: DANUBIA PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS; H-1368 Budapest 5, Pf. 198., Bajcsy Zsllin stry at 16., H-051 Budapest (HU).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

(54) Title: QUANTITATIVE FLUORESCENT ASSAY FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF TRANSPORT PROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to a simple quantitative fluorescent assay method for determining the activity of transport proteins, more specifically multi-drug resistance associated proteins (MRPs). The method of the invention is performed on a well-sealed culture of polarized cells expressing a transport protein of interest grown to confluency on a permeable support, said confluent cell culture forming well separated apical and basolateral compartments. The cells are contacted with a cell-permeable non-fluorescent derivative of a fluorescent compound (e.g., calcein AM) in one compartment and, after a certain period of incubation, the fluorescence intensity detected from sample taken from the opposite compartment is indicative of the activity of the transport protein of interest expressed in the cells. The invention also concerns methods for the qualitative and quantitative determination of inhibitors and activators of transport proteins of interest and methods for assessing basolateral and/or apical localization of plasma membrane bound transport proteins of interest in polarized cells.

WO 02/003066 A3

WO 02/003066 A3



IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, OAPI (p.200) (BF, B3, C3,
CG, CL, CM, GA, GN, GW, MI, MR, NI, SN, TD, TG)

(88) Date of publication of the international search report:
22 August 2002

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC/HU 01/00074									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/50 601N33/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification or system followed by classification symbols) IPC 7 601N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base or consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>HOLLO ZSOLT ET AL: "Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells." FEBS LETTERS, vol. 383, no. 1-2, 1996, pages 99-104, XP002196137 ISSN: 0014-5793 cited in the application</td> <td>3-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>abstract page 100, column 2, paragraph 2 page 103, column 1, paragraph 4 -/-</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	HOLLO ZSOLT ET AL: "Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells." FEBS LETTERS, vol. 383, no. 1-2, 1996, pages 99-104, XP002196137 ISSN: 0014-5793 cited in the application	3-9	Y	abstract page 100, column 2, paragraph 2 page 103, column 1, paragraph 4 -/-	1-9
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	HOLLO ZSOLT ET AL: "Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells." FEBS LETTERS, vol. 383, no. 1-2, 1996, pages 99-104, XP002196137 ISSN: 0014-5793 cited in the application	3-9									
Y	abstract page 100, column 2, paragraph 2 page 103, column 1, paragraph 4 -/-	1-9									
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of substantial relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel, or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document: member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 3 May 2002		Date of mailing of the international search report 22/05/2002									
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5518, Patenkamp 2 NL - 6200 PH The Hague Tel (+31) (0) 940 2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31) (0) 940 3016		Authorized officer Pellegrini, P									

Form PCT/IS/HQ(2010)2/Standard (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/HU 01/00074
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRAVO PILAR ET AL: "Efficient in vitro vectorial transport of a fluorescent conjugated bile acid analogue by polarized hepatic hybrid WIF-B and WIF-B9 cells." HEPATOLOGY, vol. 27, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 576-583, XP001059103 ISSN: 0270-9139 the whole document	1-9
Y	KIM ANNICE E ET AL: "Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein." JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 386, no. 3, 1998, pages 1439-1445, XP001073487 ISSN: 0022-3565 abstract page 1998, column 1, paragraph 3 page 1442, column 1, paragraph 4 -page 1443, column 1, paragraph 1	1-9
Y	EVERS RAYMOND ET AL: "Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 97, no. 5, 1996, pages 1211-1218, XP002196088 ISSN: 0021-9738 cited in the application abstract page 1216, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1	1-9
A	WO 96 06945 A (HOLLO ZSOLT ; HOMOLYA LASZLO (HU); SARKADI BALAZS (HU)) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application claims 1,13,14	1-9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) July 1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				National Application No.	
Information on patent family members				PCT/HU 01/00074	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9606945	A	07-03-1996	HU 72700 A2	28-05-1996	
			AT 182179 T	15-07-1999	
			CA 2198731 A1	07-03-1996	
			DE 69510809 D1	19-08-1999	
			DE 69510809 T2	16-03-2000	
			EP 0784699 A1	23-07-1997	
			ES 2137538 T3	16-12-1999	
			WO 9606945 A1	07-03-1996	
			US 2001019846 A1	06-09-2001	
			US 5872014 A	16-02-1999	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ホモリャ ラツロ

ハンガリー ハー 1 0 1 3 ブダペスト クリツティーナ クルト 2 8

(72)発明者 サルカディ バラツツ

ハンガリー ハー 1 1 2 1 ブダペスト アグネス ウー 2 3 / ベー

(72)発明者 エフェルス ライモント

ドイツ連邦共和国 6 3 0 7 1 オッフェンバッハ アム マイン キンツィッヒヴェッヒ 7

Fターム(参考) 2G054 AA08 CA23 CA28 CE02 EA03 GA04

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR66 QR69 QS24 QX02