

DOI:10.14753/SE.2023.2898

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

2898.

TEMESSZENTANDRÁSI-AMBRUS CSILLA

Patobiokémia
című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Sarkadi Balázs, egyetemi tanár

Membrántranszporterek a xenobiotikum-gyógyszer és gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokban

Doktori értekezés

Temesszentandrás-Ambrus Csilla

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sarkadi Balázs, az MTA tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Padányi Rita, Ph.D., tud. főmunkatárs

Dr. Pomozi Viola, Ph.D., tud. munkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Váradi András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
2.1. Az ABC és SLC transzporterek áttekintése	8
2.2. Transzport fehérjék a fiziológiás barrieréken	12
2.2.1. Az intesztinális felszívódást befolyásoló transzporterek.....	13
2.2.2. Transzporter hatások a vesén keresztüli kiválasztásban.....	14
2.2.3. Membrántranszporterek a vér-agy gátban	15
2.2.4. Transzporterek a hepatobiliáris eliminációban.....	16
2.3. Az ABCB4 fehérje és lehetséges szerepe a gyógyszeres májkárosodásban.....	18
2.4. A transzporter vizsgálatok szerepe és helye a gyógyszerfejlesztés folyamatában	20
2.5. Az in vitro transzporter vizsgálatok típusai	22
2.5.1. Membránalapú esszék.....	22
2.5.1.1 Az ATPáz esszé	22
2.5.1.2 Vezikuláris transzport esszé	23
2.5.2. Sejtalapú esszék	24
2.5.2.1 Festék transzport esszék	24
2.5.2.2 Citotoxicitás esszék	24
2.5.2.3 Vektoriális transzport esszék.....	25
2.5.2.4 Uptake esszé	25
2.6. Xenobiotikumok, növényi hatóanyagok és gyógyszerek interakció vizsgálatai ...	26
3. Célkitűzés	28
4. Módszerek	30
4.1. Reagensok és pufferek	30
4.2. Membránpreparátumok és ATPáz esszé.....	32
4.3. ABCB1 és ABCG2 sejtes festéktranszport mérések	33
4.4. Membránvezikulák preparálása és vezikuláris transzport gátlás esszé (VT).....	34
4.5. Uptake (SLC) transzportert kifejező sejtvonalak és esszék.....	36
4.6. ABCB4-expresszázó sejtvonala és transzcelluláris esszék	38
4.7. Adatok értékelése, kalkulációk	41

5. Eredmények	43
5.1. Az újonnan fejlesztett potenciális antituberkulotikumok, MtTopo-I inhibitorok transzporter kölcsönhatás vizsgálatai.....	43
5.2. COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek DDI rizikójának meghatározása	48
5.3. ABCB4 kölcsönhatás vizsgálatok eredményei, azonosított, irodalomban még nem leírt új gyógyszer-subsztrátok és gátlószeresek	63
5.4. A baicalin potenciális transzporter, növényi hatóanyag-gyógyszer interakciók vizsgálatának eredményei	75
6. Megbeszélés	80
6.1. MtTopo-I inhibitorok transzporter kölcsönhatásai	80
6.2. COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek transzporter kölcsönhatásai.....	83
6.3. Az ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatása	89
6.4. A baicalin és OATP transzporterek kölcsönhatása.....	92
7. Következtetések	94
7.1. Újonnan fejlesztett Mycobacterium tuberculosis topoizomeráz-I inhibitorok kölcsönhatásának vizsgálata humán ABC transzportfehérjékkel	94
7.2. A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek DDI rizikójának meghatározása	94
7.3. Nem-májsejt alapú teszrendszer létrehozása ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatásának vizsgálatára	96
7.4. A baicalin kölcsönhatása OATP transzporterekkel	97
7.5. Összegzés.....	97
8. Összefoglalás	99
9. Summary	100
10. Irodalomjegyzék	101
11. Saját publikációk jegyzéke	132
11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények	132
11.2. Disszertációtól független közlemények	132
12. Köszönetnyilvánítás	134

1. Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP Binding Cassette, ATP-kötő kazetta
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztás
ADMETox	absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztás, toxicitás
ADP	adenozin-difoszfát
AMP	adenozin-monofoszfát
ASBT	apical sodium–bile acid transporter; apikális nátrium-epesav transzporter
ATP	adenozin-trifoszfát
BB	benzbromaron
BCA	bicinchoninic acid assay; bikinkoninik sav esszé
BCRP	breast cancer resistance protein; emlőkarcinóma rezisztencia fehérje
BSA	bovine serum albumin; szarvasmarha szérum albumin
BSEP	bile salt export pump; epesó export pumpa
CAM	calcein acetoximetil
Caco-2	carcinoma coli-2; kolon karcinóma-2
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CDCF	5-(and-6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CYP	citokróom P450
DDI	drug-drug interaction; gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás
DHEAS	dehidroepiandroszteron szulfát
DILI	drug-induced liver injury; gyógyszer okozta májkárosodás
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil-szulfoxid

DTT	ditiotreitól
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
EMA	European Medicines Agency; Európai Gyógyszerügynökség
ER	Efflux Ratio; efflux hányados
ETBG	ösztadiol 17-beta-D-glükuronid
E3S	ösztron-3-szulfát
FBS	fetal bovine serum; magzati borjú szérum
FDA	Food and Drug Administration; Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hivatal
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GLUT	glükóz transzporter
HBSS	Hank's Balanced Salt solution
HBV	hepatitis B vírus
HCV	hepatitis C vírus
HDV	hepatitis D vírus
HEK293	human embryonic kidney 293 cell; humán embrionális vese 293 sejt
HRP	horseradish peroxidase; torma-peroxidáz
IC ₅₀	50%-os gátló hatást okozó koncentráció
KO	knock-out (génkiütött)
Ko	Ko143
LLC-PK1	Lewis-lung cancer porcine kidney 1
MATE	multidrog és toxin extrúziós
MDCKII	Madin-Darby canine kidney strain II
MDR	multidrug resistance; multidrog rezisztencia
NBD	nucleotide binding domain; nukleotidkötő domén
NMQ	N-methyl-quinidine; N-metil-kinidin
OAT	organikus anion transzporter
OATP	organikus anion transzportáló polipeptid

OCT	organikus kation transzporter
Papp	apparent permeability; látszólagos permeabilitás
PBS	phosphate buffered saline; foszfát pufferelt sóoldat
PFA	paraformaldehid
P-gp	permeability glycoprotein; permeabilitás glikoprotein
Pi	anorganikus foszfát
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; Gyógyszerészeti és Orvosi Eszközök Ügynöksége
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
SDS	sodium dodecyl sulphate; nátrium-dodecil-szulfát
Sf9	Spodoptera frugiperda clonal isolate 9; őszi sereghernyó 9-es klonális izolátum
SLC	solute carrier; oldott anyag szállító
TAP	Transporter associated with antigen processing; antigén feldolgozáshoz kapcsolódó transzporter
TC	taurokolát
TMD	transzmembrán domén
VS	valspodar
VT	vezikuláris transzport

2. Bevezetés

Az emberi szervezetben az epitélisejtek és azok specializált formái fiziológiás határfelületeket alkotnak. A szöveti kötetékbe rendeződő epitélisejtek működésének alapvető feltétele, hogy a sejtkapcsoló struktúrák és a molekulák szabad mozgását korlátozó folyamatok szabályozására különböző membránrégiók alakuljanak ki, vagyis a sejtek polarizálódjanak. A különböző sejtípusok eltérő igényüknek megfelelően különféle, az adott sejtípusra jellemző transzporter fehérjéket fejeznek ki. Csak nagyon kevés molekula képes fehérjék közreműködése nélkül belépni a sejtbe vagy elhagyni azt. A molekulák komplex fizikokémiai tulajdonságai részben meghatározzák azok sejtbarrieren való átjutását, passzív permeabilitását (1). Aktív és passzív transzportjukat az integráns membránfehérjék nagy csoportjai az ABC transzporterek, ATP-áz pumpafehérjék (2), a csatornafehérjék (3) és az oldottanyag szállító fehérjék végzik.

A multispecifikus gyógyszertranszporterek az ATP-kötő kazetta (ABC) és az oldott molekulákat hordozó (SLC) transzporterek szupercsaládjába tartoznak (4). Ezek fiziológiás szerepük mellett döntően befolyásolják a gyógyszerek abszorpcióját, disztribúcióját, metabolizmusát, eliminációját (ADME) és toxicitását (5, 6). A transzporterek pontos szerepének megértése a gyógyszerek szervezeten belüli sorsának alakításában nem könnyű, mivel egyesek ubikviterek, míg mások specifikusan és eltérő mértékben expresszálódnak; gyakran széles, átfedő szubsztrát- és inhibitorspecificitást mutatnak, egymással és metabolikus enzimekkel koordináltan működnek (7). Egy adott gyógyszer egyidejűleg lehet több transzporter és/vagy metabolikus enzim szubsztrátja, gátlószere, befolyásolhatja expressziójukat is, így a komplex mechanizmusok megértése klinikai farmakokinetikai szempontból még mindig kihívásokkal teli. Példaként említhetjük a bozentánt, egy endotelin receptor antagonistát (8). A bozentán a CYP2C9 és CYP3A4A enzimekkel metabolizálódik, a ketokonazol, mint CYP3A4 gátló megemeli plazmaszintjét, míg CYP indukálószerrel - ciklosporinnal, glibenklamiddal, warfarinnal - hosszútávon alkalmazva plazmaszintje csökken. A hepatocitákba OATP fehérjék közreműködésével kerül, DILI-t okozhat, glibenklamiddal együttzedve májkárosító hatása még kifejezettebb lehet. Ismert, hogy a

bozentán az ABCB11 gátlószere, az ABCC2 működését aktiválja. A fenti membrántranszporter és metabolikus enzim kölcsönhatások jól szemléltetik a folyamat komplexitását (9).

A gyógyszerhatósági előírások (FDA, EMA, PMDA) és a növekvő gyógyszeripari igények miatt a multispecifikus gyógyszertranszporterek működésének és a transzporterek szintjén megvalósuló gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatások feltérképezése intenzív kutatás tárgya. Az FDA és EMA ma már előírja a bevezetésre váró új gyógyszerek és egyes farmakokinetikai szempontból kulcsfontosságú transzporterek vizsgálatát és javaslatot tesz a karakterizálásra legalkalmasabbnak tartott *in vitro* módszerekre. Az irányelvek *in vitro* küszöbértékeket határoznak meg, ezzel segítve a transzporter-mediált gyógyszerkölcsönhatások klinikai vizsgálatának tervezését, kivitelését.

2.1. Az ABC és SLC transzporterek áttekintése

Az ABC és SLC transzporterek szupercsaládjába jelen tudásunk szerint több mint 500 fehérje tartozik (10, 11). Az eddig megismert 48 humán ABC transzportert 7 alcsaládba (ABCA-G) sorolják (10). A transzporterek nevezéktana ma egységes, a Humán Genom Organizáció (HUGO) Gén Nomenklatúra Bizottsága (12) minden génhez és az általa kódolt fehérjéhez egyértelmű azonosító megjelölést ad. Az egyes transzporterek nevét az alcsalád nevéből képezik egy, a transzportert definiáló szám hozzáadásával. Ugyanakkor a transzporterek esetében különösen igaz, hogy a hivatalos, szisztematikus név mellett továbbra is elterjedtek a hagyományos elnevezések. Így például az ABCB1 fehérje elterjedt megnevezése az MDR1 vagy P-gp, az SLC22A6 transzporter OAT1 néven is ismert.

A legtöbb emlős ABC transzporter elsődleges aktív transzporterként működik, a szubsztrátok sejtből való eltávolítását végzi, az efflux transzporthoz az energiát az ATP hidrolízise szolgáltatja. Kivételt képez ez alól a retinában expresszálódó ABCA4 (13), a klorid csatorna CFTR (14), és a szulfonilurea receptorok, a SUR1 és SUR2 (15). Az ABC transzporterek nevüket a konzervatív ABC (ATP Binding Cassette) doménekről kapták, melyeket NBD

(Nucleotide Binding Domain) néven is ismerünk. A citoplazmában lokalizálódó, enzimatisz aktivitású NBD karakterisztikus elemei a 90-120 aminosavnyi távolságra lévő Walker A és Walker B motívumok, valamint a Walker B előtt található signature C motívum (16). A funkcionális ABC fehérje tipikusan két NBD és két transzmembrán doménből (TM) épül fel. Az egyes transzmembrán domének 6-11 transzmembrán alfa-hélixből állnak, főként a szubsztrátkötésért felelősek. Számos eukarióta ABC transzporterre jellemző, hogy a transzmembrán domének összekapcsolódnak a nukleotid kötő doménnel, és két ilyen entitás hoz létre egy funkcionális ABC transzportert, tipikusan homo- vagy heterodimer formában. Ugyanakkor több eukarióta ABC transzporterre jellemző, hogy 4 doménje alkot egy funkcionális egységet. Egy hosszú összekötő (linker) szekvencia a nukleotid kötő domén 1 (NBD1) C-terminusát összekapcsolja a TMD2 N-terminálisával (10). Az ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11 fehérjékben, valamint az ABCA, és az ABCC alcsaládok tagjaiban megtalálható ez a linker szekvencia. Az ABCC alcsalád néhány tagja egy extra transzmembrán domént (TMD0) is tartalmaz N-terminálisan (17). A fél transzporterek egy NBD-t és egy transzmembrán domént tartalmaznak, dimer vagy oligomer formában funkcionálisak. Fél transzporterek az antigén processzázásban kulcsszerepet játszó TAP1 és TAP2 fehérjék (18), és az ABCG alcsalád tagjai is. Az ABCG proteinek struktúrája is egyedülálló, az NBD az amino terminálison, TM domén a karboxi-terminálison helyezkedik el (19).

Az ABC transzporterek fiziológias szerepe sokrétű, s az alcsaládok is diverz funkciójú tagokat foglalnak magukba. Az ABCA alcsalád legtöbb tagja a lipidek, többek közt a koleszterol, foszfolipidek transzportjában és egyes sejtek lipid homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet (20, 21). Az ABCA transzporterek mutációi súlyos betegségeket okoznak. Harlequin ichthyosis kialakulásához vezet az ABCA12 funkcióvesztése (22), az ABCA1 loss-of-function variánsa Tangier betegség kialakulásához vezet. Ez utóbbi kórképre jellemző a sejtekből történő koleszterol efflux csökkenése, és a keringő high-density lipoprotein (HDL) hiánya (23).

Az ABCB alcsalád prominens tagja az ABCB1 (MDR1, P-gp). Elsőként azonosították, mint a gyógyszertranszportban jelentős szerepet játszó transzportert (24, 25). Ubikviter, magas az expressziója a barriereken, mint a vékonybél hámsejtek luminális membránjában, a vér-agy

gát kapillárisaiban, a kiválasztást végző proximális tubulus és a májsejtek apikális membránjában (26). Egyes tumorsejtekben is nagymértékben expresszálódik (27, 28). Fiziológiásan a testidegen anyagok, xenobiotikumok sejtekbe jutását szabályozza (29). Szubsztrátspecifitása rendkívül széles, neutrális vagy pozitívan töltött hidrofób molekulákat preferál (30). Gyógyszerrezisztencia kialakulását okozhatja (31), s fontos szerepet játszik a gyógyszer ADME-ban (32). Az ABCB4 és ABCB11 fehérjék a májban expresszálódnak, az epeképzésben játszanak főszerepet. Az ABCB4 foszfatidil-kolinokat választ ki (33), míg az ABCB11 a konjugált epesavak transzportját végzi (34). Mutációik enyhe vagy súlyos májbetegségeket okozhatnak, példaként említve a progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázist (35, 36). Gátlásuk gyógyszer-indukálta májkárosodás (DILI) kialakulásához vezethet (37-39). Az alcsalád féltranszporter tagjai a processzált peptidantigéneket a citoszólból endoplazmás retikulumba szállító TAP1 és TAP2 fehérjék (40).

Az ABCC alcsalád tagjai is igen eltérő funkciójú fehérjék. Az ABCC1 hidrofób és anionos molekulák, glükoronid és glutation konjugátumok és a glutation effluxát végzi (41). A leukotrién C₄-et (LTC₄) termelő sejtekből elősegíti annak szekrécióját (42, 43). Működése kapcsolatba hozható a klinikai multidrog rezisztencia jelenségével is (44). Az ABCC2 kizárólag a polarizált sejtek apikális membránjában expresszálódik (45), s endogén vagy xenobiotikum organikus anionok, glükuronid, szulfát, glutation konjugátumok transzportját mediálja (46, 47). Az ABCC3 polarizált sejtek bazolaterális membránjában expresszálódik, magas szinten fejeződik ki a májban és a gasztrointesztinális traktusban (48, 49). Endogén szubsztrátjai az ösztradiol-17-béta-glükuronid, androgén glükuronidok (50), a LTC₄, monovalens epesók mint a kolát és a glikokolát valamint egyéb glükuronid konjugátumok (pl.: fitoösztrogének, rezveratrol és kurkumin) (51). Szerepet játszik az epesók enterohepatikus körforgásában (52) is. Az ABCC4 a máj, choroid plexus, gasztrointesztinális traktus sejteinek bazolaterális membránjában, a proximális tubulus, agyi kapillárisok endotél sejteinek apikális membránjában expresszálódik (53). Intra- és intercelluláris mediátorok, ciklikus nukleotidok, eikozanoidok, urát, konjugált szteroid hormonok transzportjában játszik szerepet (54). Az ABCC5 képes cAMP, cGMP transzportjára (55), az ABCC6 elsősorban a májban fejeződik ki (56), deficienciája pseudoxanthoma elasticum kórkép kialakulásához vezet (57).

Az ABCD alcsaládba tartozó 4 féltranszporter a peroxiszómákba juttatja a béta-oxidáció szubsztrátjait, a hosszúláncú zsírsavakat (58). Az ABCE és F alcsaládba tartozó fehérjéknek nincs transzmembrán doménjük, transzport funkciójuk nem ismert (59).

Az ABCG alcsaládot diverz funkciójú, reverz féltranszporter fehérjék alkotják. Az ABCG1 a makrofágok lipid homeosztázisát regulálja, koleszterolt választ ki, szerepe lehet az atherosclerosis kialakulásában (60). Az ABCG5/G8 a szterolok epébe történő kiválasztásával, a koleszterol bélből való felszívásával kritikus szerepet játszik a szervezet szterol körforgalmában (61). Diszfunkciójuk szitoszterolémiát okoz (62). Az ABCG2 multidrog rezisztencia fehérjeként funkcionál, az ABCB1 fehérjével a kemoimmunitás hálózat alapvető elemei (29). Magas expressziója és működése alapvető a fiziológiás és farmakológiai barrier funkció fenntartásában (63). Az ABCG2 legfontosabb funkcionális jellemzőit, szervezeten belüli lokalizációját, a xenobiotikumok, gyógyszerek ADMETox sajátosságaira kifejtett hatását, mutációinak jelentőségét összefoglaló közleményünk taglalja (64).

Az SLC transzporterek topológiájáról keveset tudunk, predikciók alapján 1-16 transzmembrán doménnel rendelkeznek (65, 66). A jelenleg 65 családba sorolt 458 SLC fehérje rendkívül széles szubsztrát-felismerő képességgel rendelkezik, de az egyes családok tagjaira jellemző egy általános, családon belül konzisztens szubsztrát típus preferencia (67). Az SLC-k vagy a passzív facilitált diffúzióban vesznek részt vagy szekunder aktív transzporterekként működnek (68). Ismertek terciér aktív transzporterek is, mint az OAT1 és OAT3 (69). A transzport folyamat iránya szerint feloszthatóak uniporter, például a glükóz transzporter 1 (GLUT1 (70)) és kotranszporter: szimporter, mint a nátrium-glükóz transzporter 1 (SGLT1 (71)) és antiporter, például a nátrium/kalcium cserélő (NCX (71)) fehérjékre.

Normál fiziológiás körülmények közt az SLC fehérjék különféle molekulák sejtbe való felvételét végzik. Kivételt képeznek az SLC47 családba tartozó MATE1 és MATE2K fehérjék, melyek organikus kationok szekrécióját végzik (72) és az exchangerek, melyek működésük során egy molekula felvételét egy másik molekula effluxához kapcsolják. Ilyen

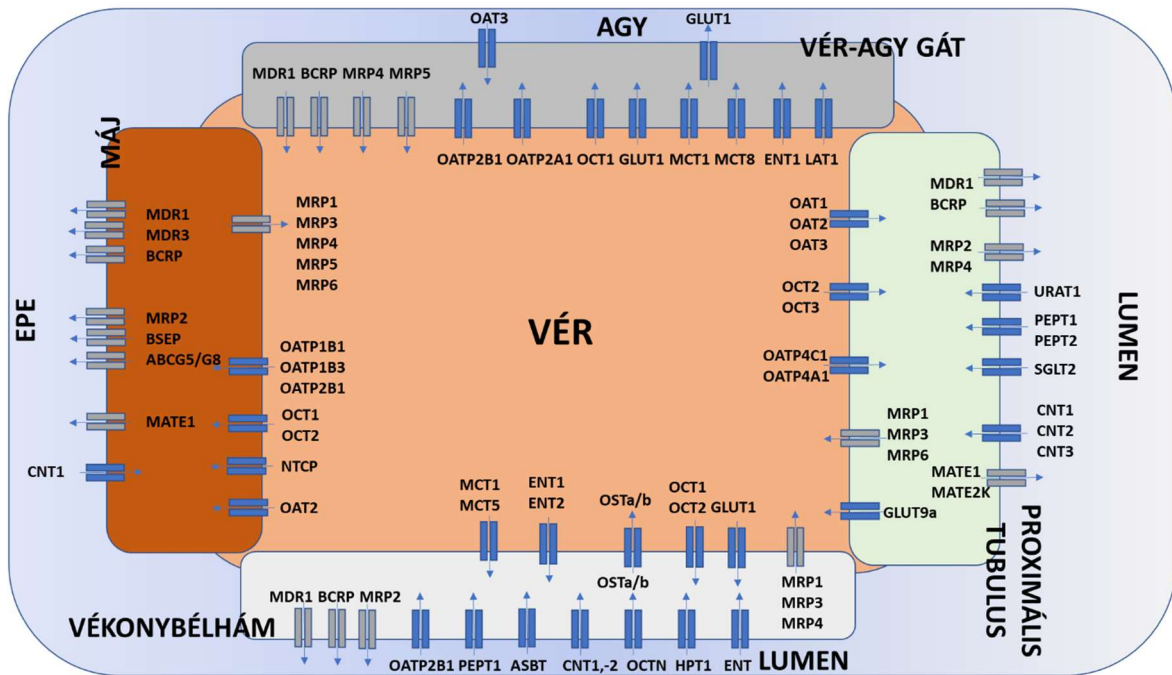
exchanger a fent említett OAT1 transzporter is, amely a para-aminohippurátot α -ketoglutarátra cseréli (73).

A SLC-k működése számos fiziológias folyamathoz kapcsolható. Az SLC1, SLC2, SLC3/SLC7, SLC5, SLC6, SLC16, SLC21, SLC22, SLC38, SLC44 és SLC47 családok tagjai a vér-agy gáton keresztüli tápanyagok transzportjában vesznek részt (74). Az SLC6 és SLC18 családokba tartozó transzporterek többek közt a neuronok, gliák membránjában expresszálódnak, s neurotranszmitterek például dopamin, szerotonin nátrium-függő felvételét mediálják (75). Transzport működésüktől függetlenül egyéb funkciójuk is ismert. Számos család tagja rendelkezik víruskötő doménnel, segítve a vírusok sejtbe jutását. Az NTCP (nátrium-taurokolát kotranszportáló protein) a HBV és szatellita vírusa, a HDV fő receptora (76), a LAT1 (L-típusú aminosav transzporter 1) heterodimer fehérje nehéz alegysége - amellett, hogy L-típusú aminosavak transzportját végzi (77) - a HCV sejtbe jutását is segíti (78). A SLC fehérjék mutációinak, upregulációjának patológias állapotok kialakulásában és fenntartásában is van szerepe (79-81). A glükóz transzporter 2 (GLUT2) gén mutációja miatt a glükóz glikogén formájában felhalmozódik a májban és a vesében, s a Fanconi-Bickel-szindróma tüneteit okozza (82). Malignusan transzformált sejtek gyakran overexpresszálnak leucin transzportereket, az így elért magasabb intracelluláris leucin koncentráció és az mTOR aktivációja a daganatos sejtek szaporodását segíti (83).

2.2. Transzport fehérjék a fiziológias barriereken

A gyógyszerfejlesztés során a vékonybélhám, a máj, a proximális tubulus epitéliumában és a vér-agy gát endotéliumában expresszálódó kulcs ADME transzporterek vizsgálatára fókuszálnak.

A négy fő barrierben legfontosabbnak tartott ADME transzportereket az 1. ábrán mutatom be. A tesztelésre ajánlott transzporterek mellett az egyes barriereken kifejeződő transzporterek közül sok kimaradt a hatósági ajánlásokból.



1. ábra: A legfontosabbnak tartott ADME transzporterek expressziója a vékonybélhamban, májban, vér-agy gáton és a proximális tubulusban. A SLC transzportereket kék szín, az ABC transzportereket szürke jelöli. A transzport irányát nyíl mutatja.

2.2.1. Az intesztinális felszívódást befolyásoló transzporterek

A felszívódás az enterociták kefeszegélye felől történik a vér- és nyirokerek irányába. Az endogén anyagok, xenobiotikumok és gyógyszerek felszívódásában SLC transzporterek játszanak szerepet. Ilyen például a széles szubsztrátspecifitású, gyógyszer-étel (84) és gyógyszer-gyógyszer (85, 86) kölcsönhatásokban is leírt OATP2B1. A peptidek és β -laktám antibiotikumok felvételét facilitáló oligopeptid transzporterek (PEPT) (87) és az epesavak enterohepatikus körforgásában kulcsszereplő ASBT (88) a prodrug megközelítés célpontjai is (89, 90). Prodrugnak nevezzük egy gyógyszervegyület inaktív prekursorát, amely kémiai és/vagy enzimatisz átalakulás után fejti ki farmakológiai hatását. A prodrug technológia

javíthat egy ígéretes hatóanyag gyenge felszívódási tulajdonságain (91). A rövid egyenesláncú alifás monokarboxilátok (acetát) és a C2- vagy C3-szubsztituált monokarboxilátok (laktát, piruvát) proton-kapcsolt transzportját végző MCT1 (92) gyógyszerek (pl.: szalicilsav) felvételét is segíti (93). A koncentratív nukleozid transzporterek (CNT) nukleozidok felvételét facilitálják, s nukleozid analóg gyógyszereket is transzportálnak (94, 95).

Az enterociták apikális membránjában kifejeződő efflux transzporterek közül a széles szubsztrátspecifitású ABCB1, az ABCG2 és az ABCC2 játszanak kiemelt szerepet a szájon át alkalmazott gyógyszerek biológiai hasznosulásában, de az ABCB1 fehérje szerepét vizsgálják leginkább. Az ABCB1 magasan expresszálódik a disztális jejunum és ileum hengerhámsejtjeinek apikális membránjában, alacsony az expressziója a gyomorban, duodenumban és a proximális jejunumban (96, 97). Az ABCB1 számos gyógyszer, mint a digoxin (98), loperamid (99) vagy talinolol (100) felszívódását befolyásolja. Az ABCB1 preferált szubsztrátjai és a májban, vékonybélben is expresszálódó CYP3A4 szubsztrátjai gyakran átfedést mutatnak (101).

Az ABCC2 dominánsan a májban expresszálódik, de a vékonybélben is kifejeződik, strukturálisan diverz xenobiotikumok és konjugátumaik felszívódását befolyásolja. Példaként említve, az ABCC2 és ABCG2 transzporter-szubsztrát flavonolignán, a szilibin biohasznosulását segíti - egyidejű alkalmazásukkor - egy szintén növényi eredetű hatóanyag, a baikalein, mivel gátolja az ABCC2 és ABCG2 transzportereket (102). A szulfaszalazin felszívódását negatívan befolyásolják az ABCC2 és ABCG2 (103), így az azonos indikációban alkalmazott, egyszerre adott indometacin az ABCC2 gátlásán keresztül megnöveli a szulfaszalazin plazmaszintjét (104). Az ABCG2 olyan gyógyszerek biohasznosulását befolyásolja, mint a topotekán vagy nitrofurantoin (105, 106).

2.2.2. Transzporter hatások a vesén keresztüli kiválasztásban

Az organikus anionok és kationok aktív szekréciója és visszaszívása javarészt a proximális tubulusokban történik. A proximális tubulus sejtjeiben expresszálódó transzporterek számos

folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszanak. Xenobiotikumok felvételét mediálják a sejtekbe, azok effluxát végzik a glomeruláris filtrátumba, visszaszívják azokat a filtrátumból és vissza is pumpálhatják azokat a vérbe.

A vese SLC transzporterei közül az OAT és OCT transzporterek családjai a legjelentősebbek (107). Az organikus anion transzporterek kicsi, vízdékony, albumin kötött anionok felvételét mediálják a proximális tubulus sejteinek bazolaterális membránjában, mint például antivirális, gyulladáscsökkentő szerek, kacsdiuretikumok, β -laktám antibiotikumok (108, 109). Az organikus kation transzporterek kationos szubsztrátok, többek közt a metformin, protonpumpa gátlók, kemoterápiás szerek felvételében játszanak szerepet (110, 111). Az OCT2 átfedő szubsztrátspecificitást mutat a MATE1 és MATE2K fehérjékkel. Funkcionális egységet alkotnak, az OCT2 által a vérből felvett xenobiotikumokat a MATE fehérjék választják ki a vizeletbe (112, 113). Az apikális ABCC2, ABCC4 efflux pumpák, és az OAT4 szubsztrát spektruma (gyulladáscsökkentő szerek, diuretikumok, β -laktám antibiotikumok, stb.) a bazolaterális organikus transzporterekéhez hasonló (114, 115). Az ABCG2 például citosztatikumok, fluorokinolok, szteroidkonjugátumok transzportjára képes (116, 117). E transzporterek gátlása késleltetheti a kiválasztást, illetve a xenobiotikumok intracelluláris akkumulációja miatt nő azok nefrotoxicitása (118, 119). Az ABCB1 a vesében is gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatások közvetítője lehet. Ismert, hogy a digoxin kiválasztása csökken, ha a renális ABCB1-et ciklosporinnal (120) vagy ritonavirrel (121) gátolják.

Mostanában a húgysav kiválasztásában, visszaszívásában szerepet játszó transzporterek (OAT1-4, URAT1, GLUT9, ABCG2, NPT) a hiperurikémia kezelésére fejlesztett gyógyszerek potenciális célpontjai (122).

2.2.3. Membrántranszporterek a vér-agy gátban

Az agy és a gerincvelő mikroszkópos értelemben a szervezet más területeitől elkülönült keringéssel rendelkeznek. A vér-agy gát mikropillárisainak endotél sejtjei szorosan

kapcsolódnak, abluminális oldaluk a bazális membránnal érintkezik, melynek kettőződésében periciták találhatók. A kapillárisokat befedik még az asztriciták végtalpai, ezzel is akadályozva a szabad diffúziót.

A vékonybélhámhoz hasonlóan az ABCB1 és ABCG2 fehérjék működése tekinthető itt is a legjelentősebbnek. A vér-agy gáton lumenálisan kifejeződő ABCB1 és ABCG2 transzporterek mellett, hogy különböző xenobiotikumok vérből agyba jutását szabályozzák, működésükkel a központi idegrendszerben a neurotranszmitterek és metabolitok szintjét is szabályozzák (123). A glükóz felvételét mediáló GLUT1, az aminosavak transzportját végző SLC5 és SLC7 család tagjai, a peptidok (SLC15), a monokarboxilátok (SLC16), az organikus anionok (SLC21) transzportjában szerepet játszó SLC transzporterek mind az agy működéséhez elengedhetetlen tápanyagok felvételét végzik (124). A centrális támadáspontú farmakonok vér-agy gáton való átjutása az efflux pumpák működése miatt korlátozott, felvételüket OATP1A2, OATP2B1 és MCT1 transzporterek segíthetik (125).

2.2.4. Transzporterek a hepatobiliáris eliminációban

A máj centrális szerepet játszik a gyógyszer-hatóanyagok, metabolitok vérszintjének és kiürülési jellemzőinek kialakításában a szerv keringési sajátosságainál fogva. A gyógyszerek hepatobiliáris eliminációjában számos folyamat működik közre. A gyógyszerek májsejtbe való felvételük után intracellulárisan átalakulhatnak (Fázis I és Fázis II metabolizmus) és kiválasztódnak vagy a vérbe vagy az epébe efflux transzporterek segítségével (52). A bazolaterálisan (szinuszdialián) expresszázó SLC transzporterek gyógyszerek felvételét mediálják a vérből, az apikális (kanalikuláris) membránra lokalizáló efflux transzporterek a gyógyszerek és/vagy metabolitjaik és epe összetevők kiválasztását végzik az epébe (126). A májban kifejeződő OATP család fehérjéi (OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1) széles szubsztrátspecificitásúak, nagyszámú gyógyszer, mint a sztatinok, proteáz inhibitorok, antibiotikumok, citosztatikumok felvételét végzik (127, 128). A gyógyszerek farmakokinetikáját az OATP fehérjék mellett a szintén multispecifikus SLC22 család (OAT, OCT) tagjai befolyásolják. Az organikus anion transzporterek organikus anionok

transzportját végzik nátrium-független módon. Az OAT2 a kreatinin, prosztaglandinok, non-steroid gyulladáscsökkentők felvételét mediálja (129). Az OAT7 eddig azonosított szubsztrátjai szulfo-, de nem glükoronid- vagy glutationkonjugált anionok (130). Eltérő szerkezetű organikus kationok felvételét az elektrogén uniporter OCT fehérjék végzik koncentrációgradiens mentén, májban az OCT1 és OCT3 szerepe jelentős (131). Epesavak és szteroidkonjugátumok koncentrációgradiensnek megfelelő felvételét facilitálja a heterodimer formában működő OST α/β (132).

A májsejtek apikális membránjában az SLC4A2 (AE2) és SLC47A1 (MATE1) fehérjék elsősorban védelmi funkciót töltenek be. Az AE2 klorid ionokat cserél bikarbonát ionokra, az epe károsító hatásától védi a májsejteket és a kolangiocitákat (133). Az ABCB1 és ABCG2 fehérjékkel együttműködve a protoncserélő MATE1 szerkezetileg különböző xenobiotikumok kiválasztását végzi (134).

Fehérjeszinten öt ABCC efflux transzporter fejeződik ki a májban. Nemcsak gyógyszerek, hanem konjugátumok (szulfát-, glutation-, és glükuronid-) transzportját is végzik. A gyakorlatban szubsztrátjaik átfednek egymással, de fiziológiás szabályzás révén a közös szubsztrátot mindig csak egy ABCC transzporter választja ki (135). Ezért lehetséges, hogy egy defektív ABCC fehérje működését más ABCC fehérjék kompenzálják. Például az ABCC2 (MRP2), de az ABCB11 (BSEP) deficienciák esetén is az ABCC3 (MRP3) és ABCC4 (MRP4) fehérjék ellensúlyozzák a csökkent működést. Ugyanez történik akkor is, ha a fenti apikális efflux transzporterek és az ABCG2 fehérje működését xenobiotikumok gátolják. Ebben az esetben a normálisan epébe kiválasztódó szubsztrátok a másik két fehérje eltérő lokalizációja miatt a szinuszodiális véráramba kerülnek (45). A bazolaterális ABCC3 és ABCC4 fehérjék expressziója fokozódik a koleztatikus májban, segítve a sérült máj regenerációját (136). Az apikálisan kifejeződő ABCC2 nemcsak gyógyszerek, konjugátumok transzportját végzi (137), deficienciája a bilirubin csökkent kiválasztásához vezet, klinikai képe a Dubin-Johnson szindrómában nyilvánul meg (138).

A kanalikulárisan kifejeződő ABCB1 a bazolaterális OCT1 transzporterrel együttműködve a kationos gyógyszerek és metabolitok epébe történő kiválasztását végzi, míg az ABCG2 az OAT2 fehérje kanalikuláris partnere lehet az anionos gyógyszerek exkréciójában (139).

A májnak nemcsak a metabolizmusban, detoxifikálásban, de novo epesav szintézisben van esszenciális szerepe, hanem az epesavak és sók, valamint gyógyszerek enterohepatikus körforgásában is (140). Az NTCP, mint szekunder aktív transzporter, nátriumcserével végzi az összes epesav, számos szteroid, tiroid hormonok és bizonyos gyógyszerek, mint például a rozuvasztatin májsejtbe való felvételét (141, 142).

A májsejt kanalikuláris membrán efflux transzportereinek működése határozza meg az epe összetételét és az epe kiválasztást. Az ABCB11 fehérje végzi az epesók kiválasztását. Funkciójának eltérése kolestatikus állapotok kialakulásához vezet, a gyógyszer okozta májkárosodásban is kulcsfontosságú szerepet játszik (34, 143). A triumvirátus következő tagjai az ABCG5/G8 fehérjék, melyek xenoszterolok és a koleszterol kiválasztását végzik (144). Az ABCB4 (MDR3) pedig floppázként működve foszfatidil-kolinok transzportját teszi lehetővé (145-148). A három kiválasztott komponens kevert micellákat képez az epében (149, 150).

2.3. Az ABCB4 fehérje és lehetséges szerepe a gyógyszeres májkárosodásban

Az ABCB4 fehérje és a multispecifikus, gyógyszer ADME-ban kulcsszerepet játszó ABCB1 fehérje között 76%-os az elsődleges aminosav szekvencia azonosság, s 85%-os az aminosav szekvencia hasonlóság (151). Az ABCB4 foszfatidil-kolinokat választ ki (33), de felmerült, hogy gyógyszer transzporterként is működhet. Korábban az ABCB4-expresszálo sejteken végzett vizsgálatok még nem igazolták a multidrog rezisztens fenotípust (151, 152), a közelmúltban viszont paklitaxel-, doxorubicin-, és vinkrisztin-rezisztens sejtvonalakban végzett kísérletek alátámasztják, hogy az ABCB4 fehérje hozzájárul a gyógyszerrezisztenciához (153-155). Pont emiatt jelenthet Wilms-tumoros betegekben a magas ABCB4 expresszió rossz prognózist (156).

Krio-elektronmikroszkópia segítségével sikerült feltárni az ABCB1 és ABCB4 közti szerkezeti hasonlóságokat. Az ABCB4 a membrán citoplazmatikus oldalának határán nagy, a TMD-ek által létrehozott hidrofób üreget tartalmaz. Ezt az üreget a zosuquidar és paklitaxel

kötőhelyeként azonosították az ABCB1 fehérjében. További mutagenézis vizsgálatokban leírták, hogy az üreg aminosav reziduumaik konzervatívak a két fehérje közt (157).

Az ABCB4 működése különleges, nehezen leírható adaptációja a foszfolipid transzport és az általános multidrogo transzport mechanizmusoknak (148, 158). A szerkezeti vizsgálatok eredményeit támasztják alá azok a közlemények, melyek leírják, hogy az ABCB4 kölcsönhat ABCB1 szubsztrátokkal és gátlószerekkel is. ABCB4 fehérjét túltermelő LLC-PK1 sejtvonalon végzett vizsgálatokban Smith és munkatársai azt találták, hogy az ABCB4 képes ismert ABCB1 szubsztrátok (digoxin, paklitaxel és vinblasztin) transzportjára, s a digoxin ABCB4-mediálta transzportját a tipikus ABCB1 inhibitorok, a verapamil, a ciklosporin vagy a valsopodar gátolták (149, 159).

Számos gyógyszer okoz kolesztázist, a kanalikuláris efflux transzporterek funkciójának gátlása révén (160). Az ABCB11 transzporter gátlásának vizsgálata mellett az ABCB4 gátlás vizsgálata a kolesztatikus kórképekben ezidáig kevés figyelmet kapott. Miután két páciensnél itrakonazol okozta májkárosodás lépett fel, Yoshikado és munkatársai állatkísérleteik során kimutatták, hogy az itrakonazol az epében az epesók mennyiségét nem, ellenben a foszfolipidek szintjét jelentősen csökkentette. ABCB4-et kifejező LLC-PK1 sejteken végzett kísérleteikben pedig igazolták, hogy az itrakonazol gátolja az ABCB4-mediálta foszfatidilkolin transzportját (161). Azol típusú gombaellenes szerek ABCB4 fehérje működésére kifejtett gátló hatását - szintén LLC-PK1-ABCB4 sejtekben - Mahdi és munkatársai vizsgálták, és azt találták, hogy az itrakonazol mellett a ketokonazol és a pozakonazol szintén gátolják az ABCB4 működését (162). Eredményeikkel azt is alátámasztották, hogy az ABCB4 és ABCB11 egyidejű gátlása számos gyógyszer kolesztatikus hatását növeli.

Primer hepatocita esszében az ABCB4-mediálta deutérium-jelölt foszfatidilkolin transzportját több, szerkezetiileg eltérő kolesztatikus gyógyszer (klórpromazin, imipramin, itrakonazol, haloperidol, ketokonazol, szakvinavir, klotrimazol, ritonavir és troglitazon) is gátolta (163). Százhuszonöt, az FDA szakemberei szerint leginkább májkárosodást okozó vagy azt egyáltalán nem okozó gyógyszer kölcsönhatását vizsgálták meg szintén primer hepatocita esszében Aleo és munkatársai. Eredményeik egyrészt arra engednek következtetni, hogy számos gyógyszer közös gátlószere az ABCB4 és ABCB11 fehérjéknek, másrészt a hepatocelluláris epesav homeosztázisban és epeképzésben szerepet játszó

transzporterek gyógyszerkölsönhatásainak együttes vizsgálata segíthet a fejlesztés során kiszűrni a májkárosodást okozó gyógyszerjelölt molekulákat (39). Kutatásaik másrészt alátámasztják a korábban leírtakat is (162).

Az ABCB4 gén mutációi és a fehérje következményes funkció változásai számos májbetegség fenotípussal társulnak (149, 164). A kolesztatikus májbetegségtől kezdve a progresszív familiáris intahepatikus kolesztázis 3-as típusán (PFIC3) át a terhességi intrahepatikus kolesztázis mellett még számos eltérő súlyosságú kórképet alakít ki (165).

2.4. A transzporter vizsgálatok szerepe és helye a gyógyszerfejlesztés folyamatában

Bizonyos gyógyszerek képesek jelentősen növelni vagy csökkenteni a velük egyidejűleg adott gyógyszerek plazmaszintjét. Ezeket a gyógyszereket elkövetőknek (perpetrator) nevezzük. A farmakokinetikai vagy farmakodinámiás változást úgy váltják ki, hogy gátolják, esetleg indukálják a metabolizáló enzimeket vagy specifikus transzportereket. Mivel az áldozat (victim) gyógyszer plazma- és szöveti koncentrációját jelentősen befolyásolhatja az elkövető gyógyszer által okozott transzporterkinetikai változás, a gyógyszertranszporterek vizsgálatai alapvető fontosságúak a gyógyszerfelfedezési és fejlesztési folyamatok során.

A transzporter vizsgálatok a gyógyszerfejlesztés folyamata során már a felfedezési (kései LOID, gyógyszerjelölt választás) és a preklinikai fázisokban is lehetővé teszik a potenciális szubsztrátok és inhibitorok azonosítását (166, 167), a lehetséges toxikus hatások felfedését (168), a farmakokinetikai sajátságok in vitro predikcióját (169).

A transzporterek befolyásolhatják a gyógyszerek szöveti koncentrációját is, s ha a farmakológiai célpont adott szöveten belül található, a farmakodinámiás hatás alakításában is kulcsszerepük lehet. Példaként említhetjük, hogy a májsejtek bazolaterális membránjában kifejeződő OATP transzporterek mediálják a sztatinok sejtbe való felvételét, ahol farmakológiai hatásukat a HMG-CoA reductáz enzim gátlásán keresztül fejtik ki (170).

Már forgalomban lévő gyógyszerek transzporter kölcsönhatásait is vizsgálhatjuk, hisz a transzporter vizsgálatok segíthetnek a nem várt mellékhatások értelmezésében. Példaként

említhetjük, hogy a JAK2 inhibitor, fedratinib klinikai vizsgálatait fázis 3 szakaszban leállították, amikor kiderült, hogy a mielofibrózisban szenvedő betegek egy részénél a fedratinib kezeléssel összefüggésben tiamin hiány következtében fellépő Wernicke-féle encefalopátia alakult ki (171). Más JAK inhibitorokkal összefüggésben nem jelentettek tiamin deficienciát és következményes megbetegedést. A tiamin és fedratinib molekula egy részének szerkezeti hasonlósága miatt *in vitro* és *in vivo* megvizsgálták, hogy a fedratinib gátolhatja-e a tiamin transzporterek (THTR1 és THTR2)-mediálta intesztinális és cerebrális tiamin felvételt. Zhang és munkatársai azt találták, hogy a fedratinib potensen gátolta a THTR2-mediálta tiamin felvételt. Így a fedratinib plazmakoncentrációját figyelembe véve (5-10 μM) a transzporter gátlása, a gasztrointesztinális tünetekkel együtt (malabszorpció) hozzájárulhat a Wernicke-féle encefalopátia kialakulásához (172). Mások ezt a kölcsönhatást állatkísérletes adatok alapján nem találták relevánsnak (173). Jelenleg, a kezelés megkezdése előtt és alatt is ellenőrzik a páciensek tiamin szintjét, s ha szükséges gondoskodnak a megfelelő tiamin pótlásról (174).

Már forgalomban lévő gyógyszerek esetén folyamatosan monitorozzák a transzporter-gyógyszer kölcsönhatások lehetőségét. Az *in vitro* vizsgálatok ebben az esetben is segíthetnek megérteni a klinikai jelenségeket, s az újonnan talált transzporter-gyógyszer kölcsönhatásokkal, ha az *in vivo* is releváns, aktualizálják a betegtájékoztatót. Például a magasvérnyomás-betegség kezelésére használt valzartán már 10 éve forgalomban volt, amikor megvizsgálták, hogy mely transzporterek vehetnek részt hepatobiliáris transzportjában. Az *in vitro* vizsgálatok megerősítették a klinikai tapasztalatot, hogy egyéb, OATP transzportereket gátló gyógyszerekkel történő együttadása farmakokinetikai változáshoz vezethet (175).

Az FDA, EMA és PMDA irányelvei az utóbbi időben harmonizálttá váltak. Javaslatot tesznek a vizsgálandó transzporterekre, a vizsgálati módszerekre és döntési algoritmusokkal, *in vitro* alsó küszöbértékek megállapításával segítik a klinikai vizsgálatok tervezését (12, 176, 177).

Számos *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* módszer áll rendelkezésre a xenobiotikumok és transzporterek kölcsönhatásának vizsgálatára.

Az ideális in vitro kísérleti megközelítés több szempontot is figyelembe vesz. Ilyen tényezők például a tudományos kérdés, a gyógyszerjelölt fizikokémiai tulajdonságai, a vizsgálat végeredménye (kinetikai paraméterek, uptake klírens, efflux hányados, stb.) és a fejlesztési folyamat stációja (felfedezési vagy már klinikai fázis).

A kísérleti tesztrendszereknek több feltételnek is meg kell felelnie. A megbízhatóságot igazolni kell ismert transzporter szubsztrátokkal és inhibitorokkal, ezek egy része kontrollként beépül a kísérleti rendszerbe, az eredmények megfelelőségét igazolja. Előnyös, ha az alkalmazott próba szubsztrátok és gátlók segítik az in vitro eredmények extrapolálását a klinikai szituációra. A vizsgált anyag koncentrációját, az inkubációs időt is körültekintéssel választják meg, a megfelelő jel-zaj arány eléréséhez. Az eredmények értelmezéséhez a teszt rendszerre alkalmazható számolási metódus használható.

A dolgozat tematikájához illően a továbbiakban az in vitro tesztlehetőségeket ismertetem.

2.5. Az in vitro transzporter vizsgálatok típusai

A transzporter esszék lehetnek membrán- vagy sejtalapúak.

2.5.1. Membránalapú esszék

A membránalapú esszék elsősorban az ABC transzporterek vizsgálatát teszik lehetővé. A membránpreparátumok a vizsgálni kívánt ABC-transzportert túltermelő sejtekből készülnek.

2.5.1.1 Az ATPáz esszé

Az ATPáz esszé azon az elven alapul, hogy az ABC-transzporterek szubsztrátjaik kipumpálásához az ATP hidrolíziséből származó energiát használják. Kimutatták, hogy az ATPáz aktivitás és a drogzanszport szorosán kapcsolt aktivitások, így a szubsztrátfüggő

ATP-hidrolízis során keletkező anorganikus foszfát egyszerű kolorimetriás módszerrel detektálható. A módszer lehetővé teszi mind a transzporter szubsztrátok, mind az inhibitorok vizsgálatát (178). Előnyei, hogy olcsó, a vizsgált anyag interakciójának indirekt mérését teszi lehetővé egy közös mérendő faktoron (Pi) keresztül, nagy áteresztőképességű és az egyetlen megbízható esszé a magas permeabilitású szubsztrátok vizsgálatára.

Bár sok szubsztrát esetén pozitív korrelációt mérhetünk a transzport és ATPáz aktivitás között előfordul negatív korreláció is, feltehetőleg nehezen átjutó szubsztrátok esetén és akad ATPáz aktivitást nem befolyásoló szubsztrát is (fals negatív lehetősége). Ennek oka feltehetőleg az elég jelentős ún. alap ATPáz aktivitás, amely szubsztrát hiányában mérhető. Az alapaktivitás máig vitatottan származhat lipid flippáz vagy szétkapcsolt aktivitásból. Ezzel együtt mind a pozitív, mind a negatív korreláció esetén bizonyítja a transzporter specifikus kölcsönhatást és lehetővé teszi a kölcsönhatás erősségének jellemzését.

2.5.1.2 Vezikuláris transzport esszé

A gyógyszerek és endogén szubsztrátok egyirányú effluxát végző transzporterek, például a hepatociták kanalikuláris membránjában kifejeződő ABCB11 transzporter vizsgálatára az intakt sejtalapú metódusok nem a legalkalmasabbak, mert hiányzik a releváns uptake mechanizmus. Az ilyen fehérjék transzport tulajdonságait előnyös olyan membránpreparátumon végezni, mely részben ún. kifordított vezikulákat (inside-out vesicle, IOV) is tartalmaz. Az ABC transzporter szubsztrát kötőhelye így a vezikula külső részén van, s ATP jelenlétében a szubsztrátokat a vezikula belsejébe pumpálja. Ezek a vezikulák megfelelő szűrési technikával elválaszthatók és a felhalmozott molekula detektálható, mennyiségileg meghatározható. Előnyei, hogy információt nyerhetünk a transzporter szubsztrátspecificitásáról, ko-faktor igényéről és a szubsztrát affinitásáról. Nagy áteresztőképességű módszer szubsztrátok és inhibitorok részletes szerkezet és kinetikai jellemzők összefüggéseinek vizsgálatára, illetve ideális az alacsony passzív permeabilitású anyagok kölcsönhatásainak feltérképezésére is. Mivel a vezikulák nem élő sejtek, lehetőséget nyújtanak a más esszékben citotoxikus hatású anyagok vizsgálatára is. Az esszék egyik

jellemző formájában egy jól detektálható szubsztrát felhalmozására vonatkozó gátlóhatás formájában mérik az interakciót a transzporterrel, ami nem igényli a vizsgált anyag specifikus detektálását. Hátránya, hogy magas passzív permeabilitású anyagok vizsgálatára nem alkalmas, s hidrofób anyagok magas háttérrel adnak a nem-specifikus kötődés miatt.

2.5.2. Sejtalapú esszék

Sokkal komplexebb információt szolgáltatnak. Primer sejtek és alternatívaként ezekből létrehozott sejtvonalak (RPTEC, HepaRG) transzporter kölcsönhatások vizsgálatára kevésbé elterjedtek, kivéve a májsejteket. Elsősorban szelektált vagy túltermelő sejtvonalakat alkalmaznak ezen vizsgálatok elvégzésére.

2.5.2.1 Festék transzport esszék

A korábbi kutatások alapján megismert alkalmas fluoreszcens szubsztrátok intracelluláris akkumulációját az adott ABC transzporter képes mérhetően csökkenteni. Az egyes transzporterek vizsgálatára még csak kisszámú alkalmas szubsztrátot azonosítottak. Például az ABCB1 kölcsönhatás mérésére használható a calcein esszé, ahol a sejtekhez magas permeabilitású, szintelen calcein-AM-et adnak, ami a sejten belül fluoreszcens calceinné alakul és alacsony permeabilitásúvá válik. Az ABCB1 kipumpálja a calceint a sejtől, és a sejtek csökkent fluoreszcenciát mutatnak a kontroll, ABCB1-et nem tartalmazó sejtekhez képest. Az ABCB1 transzporterrel kölcsönható anyagok növelik a fluoreszcens szubsztrát halmozódást a sejtbe, így a calcein esszé lehetővé teszi az ABCB1 fehérjével kölcsönható inhibitorok és szubsztrátok azonosítását és jellemzését. Előnyei: egyszerű, gyors, költséghatékony, nagy áteresztőképességű módszer. Hátrányai, hogy indirekt kölcsönhatást mér, s az alacsony permeabilitású anyagok vizsgálatára korlátozottan alkalmas.

2.5.2.2 Citotoxicitás esszék

Elsősorban revertáló szerek vizsgálatára ideális. A módszer azon alapul, hogy a szülői sejthez képest az ABC transzportert kifejező sejtek magasabb xenobiotikum koncentráció

jelenlétében is életképesek. S ha az ABC transzporterre specifikus szerrel gátolják annak működését, a két sejt életképessége közti különbség eltűnik. Kis áteresztőképességű módszer.

2.5.2.3 Vektoriális transzport esszék

In vivo a gyógyszereknek át kell jutniuk a farmakológiai barrieréken, hogy felszívódjanak, eljussanak a farmakológiai célpontjukhoz és kiválasztásra kerüljenek. A molekuláknak ezt a transzcelluláris mozgását modellezzik a vektoriális transzport vagy másnéven kétirányú transzport vagy celluláris egysejtréteg efflux esszék. Ezt az esszé típust egy kettős kamra apparátusban végzik, ahol az apikális és bazolaterális kamrát egy szemipermeabilis filter választja el egymástól. A szemipermeabilis filterre ültetett sejtek konfluens, polarizált egysejtréteget képeznek. A sejtek közötti szoros mechanikai kapcsolatot a zonula occludens biztosítja, így a sejtek közötti, paracelluláris transzport szabályzott. A polarizált sejtek vagy endogén transzportereket (pl.: a vastagbél karcinóma eredetű Caco-2) fejeznek ki vagy transzfekció után túl is termelhetik azokat. Számos epitél sejtvonalat (pl.: MDCKII, LLC-PK1) használnak ebben a vizsgálati módszerben. Előnyei: a vékonybélhám és a vér-agy gát transzporter vizsgálatának standard módszere, mindkét irányban mérhető a molekulák fluxusa. Közepes áteresztőképességű módszer, de fejleszhető nagy áteresztőképességűvé. Hátrányai: laborintenzív, költségesebb, alacsony és magas permeabilitású molekulák vizsgálatára kevésbé alkalmas, a nem-humán eredetű sejtvonalak endogén transzporterei befolyásolhatják a mérési eredményeket, a sejtenyésztés és a mérés körülményei meghatározzák az anyagok mért permeabilitását, így a módszer nehezen standardizálható különböző laborok közt.

2.5.2.4 Uptake esszé

Az SLC transzporterek vizsgálatára legelterjedtebb vizsgálati mód az, hogy letapadó epiteliális sejtvonalakban (HEK293, MDCKII, CHO, stb.) túltermeltetik a vizsgálandó SLC transzportert. A kifejezett transzporter a sejtbe halmozza szubsztrátját (uptake), s a kontroll sejthez hasonlítva azonosíthatók az SLC transzporter szubsztrátok. A molekulák SLC transzporter kölcsönhatása vizsgálható úgy is, hogy ismert transzporter szubsztrát intracelluláris akkumulációját gátolják. Előnyei: közepes vagy nagy áteresztőképességű,

gyors, kevésbé költséges, indirekt kölcsönhatás vizsgálatára is alkalmas (magát a teszt molekulát nem kell mérni). Hátrányai, hogy főleg alacsony és közepes permeabilitású molekulák vizsgálatára alkalmas.

A máj uptake és efflux transzporterei hepatocitákban is vizsgálhatók. Frissen izolált vagy fagyasztott májsejteket használnak ültetett, szuszpenziós vagy szendvics-kultúra rendszerekben.

2.6. Xenobiotikumok, növényi hatóanyagok és gyógyszerek interakció vizsgálatai

A növényekből nyert hatóanyagok, élelmiszerek, élelmiszer komponensek, vitaminok, egyéb idegen anyagok ADMETox vizsgálatára is a gyógyszer-transzporter vizsgálatokban alkalmazott módszerek használatosak. Ezek a vizsgálatok felértékelődnek, mert a fejlett országokban egyre nagyobb teret nyer a funkcionális élelmiszerek, élelmiszer kiegészítők, bioaktív anyagokat tartalmazó nem vényköteles szerek együttesedése receptköteles gyógyszerekkel (179, 180).

Növényi hatóanyag-gyógyszer-transzporter kölcsönhatás klasszikus példája, hogy az OATP szubsztrát fexofenadin plazmakoncentrációja 65-75%-kal csökken abban az esetben, ha a gyógyszert nem vízzel, hanem grépfrút-, narancs- vagy almalével veszik be a páciensek (181). Ezen gyümölcslevek, illetve az azokban található hatóanyagok hatását más OATP2B1 és OATP1A2 gyógyszer szubsztrátok esetén is leírták (182-184).

A xenobiotikum-transzporter kölcsönhatások *in vitro* jellemzése segít feltérképezni a lehetséges *in vivo* kölcsönhatásokat. A bajkáli csucsóka a hagyományos kínai gyógyászatban több ezer éve használt gyógynövény, gyökere nagy mennyiségben tartalmaz baikalint és baikaleint. Felszívódás után a baikalein baikalinná alakul az enterocitákban, hepatobiliáris körforgásában több transzporter szerepét leírták már (185, 186). Bár „csodálatos”, széleskörű fiziológiás hatásáról rengeteg közlemény beszámol, kevés *in vivo* adat áll rendelkezésre potenciális gyógyszer és transzporter kölcsönhatásairól. Leírták többek közt, hogy OATP1B1 haplotípus-függően a baikalin csökkentette a rozuvasztatin plazmaszintjét (187) emberekben, elősegítette patkányokban a szorafenib felszívódását (188).

A transzporterek tehát fontos szerepet játszanak a gyógyszerfejlesztés folyamatában, azok farmakokinetikai tulajdonságainak megértésében, a xenobiotikumok szervezeten belüli lehetséges sorsának feltérképezésében. Az alkalmazott in vitro esszék fontos eszközök a transzporter kölcsönhatások leírására. Míg korábban elsősorban a klinikai megfigyelések vezettek oda, hogy a gyógyszerek ADMETox sajátosságainak alakításában a transzporterek szerepét feltételezték, ma már ez a terület dinamikus fejlődik és az in vitro eredmények már a klinikai vizsgálatok tervezéséhez is elérhetőek.

3. Célkitűzés

A kutatómunkához részben már rendelkezésre álltak a szükséges, jól karakterizált alapmódszerek, technikák. A kísérletes munka e módszereket a gyógyszermolekulák transzporter kölcsönhatásainak vizsgálatára is optimalizálta. Munkám során szerettem volna megmutatni a transzporter vizsgálatok széleskörű gyakorlati alkalmazásának lehetőségét.

Részletes céljaim az alábbiak voltak:

1. Újonnan fejlesztett *Mycobacterium tuberculosis* topoizomeráz-I (MtTopo-I) inhibitorok kölcsönhatásának vizsgálata humán ABC transzportfehérjékkel

A gyógyszer-rezisztens tuberkulózis esetek számának növekedése miatt sürgető az igény új, hatásos antituberkulotikumok fejlesztésére. Egyik lehetséges gyógyszer célpont lehet az MtTopo-I, mikobakteriális DNS repair enzim specifikus gátlása. A Vichem Chemie Kutató Kft. Nested Chemical Library™ molekuláinak egy részét virtuális szűréssel, az MtTopo-I enzim 3D szerkezetébe való dokkolásával vizsgálták, majd a kiválasztott molekulaszett MtTopo-I in vitro gátlóhatását, H37Rv virulens mikobaktérium törzs szaporodására kifejtett gátló hatását is ellenőrizték, illetve toxicitás vizsgálatokat is végeztek humán sejteken (189). A Vichem Chemie Kutató Kft. munkatársai által fejlesztett MtTopo-I inhibitorok közül 7 jelöltet választottunk további kísérletek elvégzésére. Nemzetközi kooperációban végzett rész munka során célunk volt egy optimalizált, számos in vitro módszert alkalmazó, humán ABC transzporter vizsgálatára is alkalmas molekulaszűrő tesztrendszer fejlesztése, mely segíti az ígéretes molekula választását.

2. A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek DDI rizikójának meghatározása

A SARS-CoV-2 vírus által okozott COVID-19 betegség kezelésére több, már egyéb indikációval forgalomban lévő, per os alkalmazott gyógyszert próbáltak ki, többek közt a klorokin, a hidroxiklorokin, a lopinavir, a ritonavir és a favipiravir molekulákat. Az ivermektin használata is felmerült számos országban, mint terápiás lehetőség. A remdezivirt parenterálisan alkalmazzák, s mai napig a terápia része. Célul tűztük ki a fenti gyógyszerek

transzporter kölcsönhatásainak vizsgálatát, főként a vér-agy gát és a hepatikus barrier transzportereire fókuszálva, s eredményeink birtokában az in vivo mellékhatások előrejelzését, magyarázatát.

3. Nem-májsejt alapú tesztrendszer létrehozása ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatásának vizsgálatára

A szinte kizárólag a májban expresszáldó ABCB4 alapvető szerepet játszik az epeképzés folyamatában, gyógyszerekkel és/vagy metabolitjaikkal történő gátlása kolesztázist és gyógyszer-indukálta májkárosodást okozhat. Májsejt alapú tesztrendszerekben az ABCB4 gátlásának vizsgálata nehézségekbe ütközik a jelenlévő ABCB1 fehérjével átfedő aktivitás és a foszfolipid kimutatásának technikai korlátai miatt is, emellett költséges is. Ezért egy olyan ABCB4-overexpresszáldó MDCKII sejtvonallal létrehozását tűztük ki célul, melyben az ABCB4 fehérjével rokon endogén kutya *Abcb1* fehérjét kódoló gént kiütöttük. Célunk volt, hogy vektoriális transzport esszében próbaszubsztrátként digoxint használva vizsgáljuk a gyógyszer-indukálta májkárosodást okozó szerek, ismert ABCB1 kölcsönhatók hatását az ABCB4 fehérje működésére.

4. Gyógynövény kivonat, a baikalin vizsgálata potenciális növényi hatóanyag-gyógyszer és transzporter interakciók feltérképezésére

A baikalein szájon át történő alkalmazása után állatkísérletekben azt találták, hogy a szisztémás keringésben a baikalin a fő metabolit, melynek eliminációja a májon át történik. Az általunk fejlesztett módszerek növényi hatóanyagok vizsgálatára is alkalmasak. Megvizsgáltuk, hogy a már ismert baikalin effluxáért felelős ABC transzporterek mellett mely, a májban expresszáldó OATP fehérje lehet felelős a baikalin hepatocitákba történő aktív felvételéért.

4. Módszerek

4.1. Reagensek és pufferek

A munkánkhoz használt vegyületek, gyógyszerek analitikai tisztaságúak voltak, és a Merck-Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. Egyéb beszerzési forrásokat a szövegben jelöltem. A remdezivir és remdezivir-SBECD Sente Lajos (Cyclolab Kft.) ajándéka volt.

A radioaktív jelölt vegyületek gyártói: Digoxin, [$^3\text{H}(\text{G})$]-, (NET222250UC); β -Ösztradiol 17-(β -D-glükuronid) [Ösztradiol-6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]-, (NET1106250UC); Taurokolát, [$^3\text{H}(\text{G})$]-, (NET322250UC); Dehidroepiandrosteron szulfát, [1,2,6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]-, (NET860250UC) a Perkin Elmer; Kinidin, [9-3H], (ART-0452) és Talinolol [ring- $^3\text{H}(\text{G})$], (ART-2058) American Radiolabeled Chemicals, Fexofenadin hidroklorid [^3H], (MT-2066); Metformin hidroklorid, [biguanidin- ^{14}C]-, (MC2043) a Moravek Biochemicals Inc.; N-metil-kinidin klorid, [$^3\text{H}(\text{N})$]-, (BL-110) Szegedi Biológiai Kutatóközpont. A vegyületeket DMSO-ban oldottuk, az ettől eltérő szolvenst jelöltem.

A potenciális antituberkulotikumok vizsgálatának kémiai háttérét a Vichem Chemie Kutató Kft. kutatói által létrehozott, szintetizált és folyamatosan fejlesztett vegyülettár, az úgynevezett Nested Chemical LibraryTM (NCL) biztosította. Munkánk során hét (VCC340963, VCC450822, VCC979812, VCC450327, VCC389777, VCC891909, VCC47849) előkísérleti eredmények alapján ígéretes vegyület további karakterizációját végeztük el.

SARS-CoV-2 koronavírus okozta megbetegedés kezelésére különféle terápiás lehetőségek merültek fel, a terápiás szerek közül a klorokin, a hidroxiklorokin, az ivermektin, a lopinavir, a ritonavir, a remdezivir és a favipiravir kölcsönhatásait tanulmányoztuk.

Az ABCB4 kölcsönhatás vizsgálatok gyógyszerei a következők: imatinib, metotrexát, itraconazol, erlotinib, lopinavir, ritonavir, szakvinavir, darunavir, azunaprevir, idelalizib, fenofibrát, flukonazol, minoxidil, szorafenib, ivermektin, acetilszalicilsav, benzobromaron, gefitinib, furoszemid, amiodaron, amlodipin, karbamazepin, ciprofloxacín, klaritromicin, ciclosporin A, diklofenák, ketokonazol, levofloxacín, pantoprazol, troglitazon, valsopodar,

verapamil, prazosin, karvedilol, zosuquidar, mibefradil, diltiazem, elacridar, kinidin, digoxin, fexofenadin és talinolol.

A kísérletekhez használt pufferek összetételét az 1. táblázat részletezi.

1. táblázat A kísérletekhez használt pufferek összetétele. Összetevők, koncentrációjuk és az oldatok pH értékei

TRIS-mannitol puffer	50 mM TRIS, pH 7,0 és 300 mM mannitol
TMEP pufferben	50 mM TRIS, pH 7,0; 50 mM mannitol, 2 mM EGTA, 2 mM DTT és proteáz inhibitor koktél: 260 μ M PMSF, 8 μ g/ml aprotinin és 0,01 μ g/ml leupeptin
APTáz esszé puffer	40 mM MOPS-TRIS, pH 7,0; 50 mM KCl, 0,5 mM EGTA-TRIS, pH 7,0; 2 mM DTT, 5 mM Na-azid, 1 mM oubain, 1 mM nátrium-ortovanadát
ATPáz detektáló reagens	2,5 mM H ₂ SO ₄ , 1% ammónium-molibdát, 0,014% kálium-antimonil-tartarát oldat, 20%-os ecetsav megfelelő térfogatarányú keveréke
HPMI médium	120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl ₂ , 0,04 mM CaCl ₂ , 5 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM glükóz, 10 mM NaHCO ₃ , 10 mM HEPES; pH 7,4
Transzport puffer	HEK293 preparátumok: 10 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 250 mM szacharóz, pH 7,4; Sf9 preparátumok: 46,5 mM MOPS-TRIS, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl ₂ , pH7,4
VT mosó puffer	HEK293 preparátumok: 10 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 250 mM szacharóz, pH 7,4; Sf9 preparátumok: 40 mM MOPS-TRIS, 70 mM KCl, pH 7,4
1x HBSS puffer	HBSS 10x (14065-049, Gibco) oldatból hígítva, 4,2 mM NaHCO ₃ , pH 7,4

KH puffer	24 mM NaHCO ₃ , 4,83 mM KCl, 0,96 mM K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O, 1,2 mM MgSO ₄ *7H ₂ O, 13 mM HEPES, 5 mM glükóz, 1,53 mM CaCl ₂ *2H ₂ O, 110 mM NaCl, pH 7,4 vagy pH 8,0
TBS-Tween	10 mM TRIS, 0,17 M NaCl, 0,1 v/v% Tween 20
Blokkoló puffer	5 % (v/v) FBS 1xPBS-ben, pH 7,4

4.2. Membránpreparátumok és ATPáz esszé

A humán ABCB1 és ABCG2 fehérjéket tartalmazó membránpreparátumok rekombináns bakulovírussal fertőzött Sf9 rovarsejtekből készültek. A vírusfelülűszők előállításához az ABCB1 és ABCG2 cDNS-t rekombináns bakulovírus transzfervektor (pAcUW21-L) használatával, BaculoGold transzfekeciós kittel állították, állítottuk elő a gyártó útmutatása alapján, korábbi munkáknak megfelelően (178, 190). Amplifikáció után a vírusfelülűszóval továbbfertőztük az 5% FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel komplettált TNM-FH médiumban, szuszpenziós kultúrában 27 °C-on, 5% CO₂ mellett tartott Sf9 sejteket. 72 óra elteltével az összegyűjtött sejtekből mechanikai homogenizálással és differenciál centrifugálással membránpreparátumot készítettünk. A sejteket proteáz inhibitor, PMSF-et (100 µM) is tartalmazó TRIS-mannitol pufferben vettük fel, majd 4 °C-on 1000 g-n 10 percen keresztül centrifugáltuk. A leülepedett sejteket kétszeri TRIS-mannitol pufferben történő mosási lépés után hipotóniás TMEP pufferben gyűjtöttük össze, majd manuálisan feltártuk őket Dounce üveg homogenizátorral, végig jégen tartva. A lizátumban elválasztottuk a sejtalkotókat egy centrifugálási lépéssel (4 °C, 1000 g, 10 perc), a membránfrakciót a kapott felülűszóból ultracentrifugálással (4 °C, 25000 g, 60 perc) ülepítettük le. A membránfrakciót TMEP pufferben reszuszpendáltuk, majd összfehérje-tartalmát módosított Lowry-módszerrel meghatároztuk. A membránpreparátumokat felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Az ATPáz aktivitás mérése a Sarkadi és munkatársai által már korábban leírt módszer szerint történt (178). Mintánként 5 µg membránfehérjét tartalmazó reakcióelegyet készítettünk jégen ATPáz esszé pufferben. A DMSO-ban oldott tesztanyagokat és a megfelelő pozitív kontroll vegyületeket (40 µM verapamil, ABCB1 vagy 5 µM quercetin, ABCG2 specifikus szubsztrát) a vizsgált ABC-transzportert tartalmazó

membránszuspenzióhoz adtuk és a reakcióelegyet tartalmazó csöveket 5 percig előinkubáltuk 37°C-on. Az ATPáz reakciót 3,3 mM MgATP hozzáadásával indítottuk el és 20 perc elteltével 5% SDS oldattal állítottuk le. A vizsgált transzporterek vanadát-szenzitív alap és drogstimulálta ATPáz aktivitását a keletkező anorganikus foszfát komplex mennyiségének kolorimetriás mérésével jellemeztük. Ehhez elkészítettük és a mintákhoz adtuk a detektáló reagenst. A reakciót 1% aszkorbinsav oldat hozzáadása indította. A 37°C-on 20 percig tartó inkubáció végén a minták abszorbanciáját 630 nm-en fotométerrel (VictorX3, Perkin Elmer) megmértük. A fent elkészített mintákkal párhuzamosan különböző koncentrációjú anorganikus foszfát kalibrációs sorozat készítettünk KH_2PO_4 oldatból. A foszfát kalibráció és a mért abszorbancia értékek segítségével meghatározhatjuk a felszabadult anorganikus foszfát mennyiségét. A viszonylag komplex mérés eredményeként a transzporter aktivitás meghatározása a mért abszorbancia értékekből csak megfelelő kontrollok alkalmazásával lehetséges. A mért anorganikus foszfát mennyiség adódik egyrészt a membránt és ATP-t tartalmazó reakcióelegy anorganikus foszfát szennyezéséből és nem-enzimatis ATP hidrolízisből származó foszfátból, másrészt jelen van egy Na-ortovanadát-inszenzitív háttér aktivitás is. Az ily módon kapott és mért anorganikus foszfátmennyiséggel korigáljuk a transzporterspecifikus Na-ortovanadát-érzékeny aktivitást. A maradék jel így már a transzporter-specifikus ATP hidrolízisből felszabaduló anorganikus foszfát mennyisége. A fentieket figyelembevéve meghatároztuk a transzporterspecifikus ATPáz aktivitást a felszabadult anorganikus foszfát (nmol)/perc/teljes fehérje tartalomként (mg).

4.3. ABCB1 és ABCG2 sejtes festéktranszport mérések

A kísérleteket már korábban lentivírusos transzdukcióval létrehozott ABCB1 és ABCG2 fehérjéket stabilan expresszáló PLB myeloid sejteken végeztük (191). A transzport méréseket is korábban közölt módszer alapján folytattuk (192, 193). Röviden összefoglalva: a sejteket 96-lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 100000 sejt/lyuk denzitásban, majd HPMI médiumban inkubáltuk őket 37 °C-on 30 percig nem fluoreszcens szubsztrát-prekurzor, ABCB1-specifikus 0,1 μM CAM (C3100MP, Thermo Fisher Scientific) vagy ABCG2-specifikus 1 μM DCV (V35003, Thermo Fisher Scientific Vybrant™ DyeCycle™ Violet

Stain) jelenlétében. A referenciaszubsztrátok intracelluláris akkumulációját a tesztanyagok (5 μM) és ismert gátlószer (ABCB1: 20 μM verapamil, 5 μM Reversin 121; ABCG2: 5 μM Ko143, 5 μM kvercetin) jelenlétében, illetve anélkül is vizsgáltuk. A fluoreszcencia értékeket CAM (exc. 485 nm/ em. 535 nm) esetén a Victor X3, DCV (exc. 360 nm/ em. 440 nm) esetén EnSpire2300 Multimode Plate Reader készülékekkel detektáltuk (Perkin Elmer). A gyógyszermolekula-jelölt anyagok relatív transzporter gátló hatását a specifikus transzporter gátlószerekkel (100 % gátlás) való összehasonlítás után határoztuk meg. Két antituberkulotikum-jelölt anyag és az ABCG2 fehérje kölcsönhatását csak áramlási citometriával (BD FACSCanto, 633 nm), mitoxantron (7,5 μM , 20 perc inkubálás) efflux gátlás mérése során tudták megvizsgálni.

A Covid-19 terápiájára használt szerek vizsgálatok ABCG2- és ABCB1-PLB-985 és ABCC1-HL-60 és a szülői sejtvonalakon PhenGreen-SK diacetát (P14313, Thermo Fisher) (ABCG2) és CAM (ABCB1 és ABCC1) transzport gátlást mérték áramlási citometriával a korábban már leírtak alapján (194). A vizsgálandó vegyületek hatását Hoechst 33342 transzport gátlás esszékben áramlási citometriás módszerrel vad típusú ABCG2- és Q141K-ABCG2 variánst kifejező HeLa sejtekkel is megvizsgálták, már korábban leírtak alapján (195).

4.4. Membránvezikulák preparálása és vezikuláris transzport gátlás esszé (VT)

Vezikuláris transzport gátlás esszékben vizsgáltuk meg gyógyszerek ABC transzporter szubsztrátok transzportjára való hatását. A rekombináns bakulovírussal fertőzött rovarsejtből származó preparátumok az ABCC1 és ABCC2 fehérjék és gyógyszerek kölcsönhatás vizsgálatát tették lehetővé. A lentivírusos transzdukcióval létrehozott ABC transzportereket expresszáló HEK293 emlős sejtekből származó membrán vezikula preparátumokat, melyek tartalmazták az ABCB1, ABCG2, ABCC2, ABCC3, ABCC4 és ABCB11 fehérjéket a SOLVO Biotechnológiai ZRt. szolgáltatta. A 2. táblázatban foglaltam össze a VT esszék kísérleti körülményeit.

2. táblázat A vezikuláris transzport esszék paramétereit. Vizsgált transzporterek és az esszében alkalmazott inkubációs paraméterek (próbaszubsztrát, koncentráció, inkubációs idő, lyukankénti összfehérje tartalom, inkubációs idő, hőmérséklet és referencia gátlószer).

	Membrán vezikula preparátum						
	Sf9-ABC		HEK293-ABC				
Inkubációs paraméterek	C1	C2	B1	G2	C3	C4	B11
Szubsztrát, (µM)	ETBG (0,1)	CDCF (5)	NMQ (1)	LY (5)	CDCF (5)	DHEAS (0,5)	TC (2)
Idő, (perc)	3	10	1	10	10	1,5	10
Protein (µg)/lyuk	12,5	30	12,5	12,5	30	50	50
Hőmérséklet, °C	37	37	37	37	37	32	37
Inhibitor, (µM)	BB (200)	BB (40)	VS (1)	Ko (1)	BB (40)	MK571 (50)	gliburid (100)

A kísérlethez jégen összemértük a transzport puffert, a megfelelő mennyiségű membránszuszpenziót és radioaktívan jelölt vagy fluoreszcens szubsztrátot. Ezt a szuszpenziót 96-lyukú lemezre szétosztottuk, és a DMSO-ban oldott, vizsgálni kívánt vegyületekből készített hígítási sorral vagy DMSO-val vagy ismert inhibitorral előinkubáltuk a fent jelzett hőmérsékleten. A reakciót 4 mM AMP vagy 4 mM ATP hozzáadásával indítottuk, s folytattuk az inkubálást adott hőmérsékleten, megadott ideig. A reakció leállításához a lemezeket jégre helyeztük és jéghideg mosópuffert adtunk minden lyukhoz. Ezt követően az elegyet 1 µm pórusméretű B típusú üvegfiltert tartalmazó lemezekre elválasztottuk (MSFBN6B10, Merck-Millipore) Millipore vákuum berendezéssel. Ötszöri hideg mosópufferes mosást követően a lemezeket megszártítottuk, a vezikulába transzportált riporterszubsztrát mennyiségi meghatározása Optiphase HiSafe (1200.437, Perkin Elmer) szcintillációs koktél hozzáadása után folyadék szcintillációs technikával 12-detektoros

MicroBeta2 szcintillációs számláló berendezéssel (Perkin Elmer) történt. A szűrőkön, így a vezikulákban maradt fluoreszcens szubsztrátokat 10 % SDS detektor oldattal leoldottuk, az így kapott mintákat 96-lyukú lemezekre vittük tovább, s a fluoreszcens jel stabilizálására 0,1 N NaOH-ot adtunk minden lyukhoz. A fluoreszcens jelet Victor X3 és EnSpire2300 Multimode Plate Reader készülékekkel detektáltuk. A specifikus transzporterfüggő transzportot az ATP-t tartalmazó és nem tartalmazó (AMP) inkubációkban mért értékek különbségéből számoltuk.

4.5. Uptake (SLC) transzportert kifejező sejtvonalak és esszék

Munkám során több, a SOLVO Biotechnológiai ZRt. tulajdonát képező SLC-transzportert kifejező sejtvonalat hoztam létre, a kifejezett fehérjék transzport tulajdonságait jellemeztem és a sejt-alapú esszéket ipari standardoknak megfelelően validáltam. A HEK293 sejtvonala az Invitrogen-től került beszerzésre, az MDCKII szülői sejtvonala a Creative Cell Kft.-től származik. A kívánt cDNS-t a GenScript szintetizálta, szekvenálta és klónoztta. A lentivírus partikulumokat HEK293FT sejtekben hoztuk létre. Az SLC-transzportert (OCT1, Ntcp, MATE1, OATP1B3, OATP2B1) túltermelő sejtvonalat lentivírusos transzdukcióval hoztuk létre. A transzdukált és antibiotikum-szelektált heterogén sejtpopulációból úgy hígítottuk a sejteket, hogy a 96-lyukú sejtenyésző lemez minden lyukába átlagosan egy sejt jusson. A monoklonok transzporter specifikus uptake aktivitását funkcionális tesztekben ellenőriztük, párhuzamosan teszteltük a transzporter expresszió stabilitását is. A fentiek szerint a legalkalmasabb klónból sejtbankot hoztunk létre. A túltermelő és üres vektorral transzdukált kontroll sejteket 10% FBS-sel (10270-106, Gibco/Thermo Fisher), GlutaMAX™-szal és 1% penicillin/streptomycinnel (09-757F Lonza) kiegészített magas glükóztartalmú (4,5 g/l) DMEM (31966-021, Gibco/Thermo Fisher) tápfolyadékban tartottuk 37°C-on, párásított, 5% CO₂-tartalmú inkubátorban. Mérésekhez a transzporter-expresszáló és kontroll sejteket kezeletlen (MDCKII) vagy poly-D-lizin kezelt (HEK293) 96-lyukú szövettenyésző lemezekre ültettük 100000 sejt/lyuk denzitásban. Az ültetést követően 16-24 óra elteltével végeztük az uptake gátlás méréseket. A konfluens kultúrákról vákuum szívóval eltávolítottuk a tápfolyadékot, a sejteket kétszer mostuk 1x HBSS, illetve a MATE1 transzporter vizsgálatokor KH pufferekkel. A lemezeket megfelelő pufferben a vizsgálandó

anyagok növekvő koncentrációjú hígítási soraival 5 percig előinkubáltuk 37°C-on. A legnagyobb transzport aktivitás mérésére szolgáló lyukakba DMSO-t mértünk, illetve specifikus gátlószereket alkalmaztunk kontrollként az arra szolgáló lyukakban. Az előinkubálást követően az oldatokat vákuum szívóval leszívtuk a sejtekről, koinkubálást indítottunk alkalmas radioaktívan jelölt szubsztrátot és a gyógyszerek hígítási sorait tartalmazó pufferben 37°C-on, a SOLVO Biotechnológiai ZRt.-nél alkalmazott, validált kísérleti körülményekkel. A 3. táblázatban foglaltam össze az uptake gátlás esszék kísérleti körülményeit. Az inkubálást jégen, jéghideg pufferrel leállítottuk, majd kétszeri mosást követően a sejteket 0,1 M NaOH-dal lizáltuk és szcintillációs koktél hozzáadása után folyadék szcintillációs technikával mértük a sejtekben akkumulálódott szubsztrát mennyiségét. A transzporter specifikus értékeket a kontroll sejteken mért háttér kivonásával kaptuk meg.

3. táblázat SLC transzportert kifejező sejtvonalak és a mérési körülmények.

Transzporterspecifikus szubsztrátok, koncentrációjuk, inkubációs idő és referencia gátlószerek.

	Sejtvonal						
	MDCKII-	HEK293-		A431-OATP			
Inkubációs paraméterek	MATE1	OCT1	NTCP	1A2	1B1	1B3	2B1
Szubsztrát, (µM)	metformin (10)	metformin (10)	TC (2)	sulfo-rodamin (0,5)	Piranin (10, 20, 20)		
Idő, (perc)	15	5	2	10	15	30	15
Inhibitor, (µM)	pirimetamin (1)	verapamil (100)	TCDC (300)	-	-	-	-

A baikalin OATP1B3- és OATP2B1-mediálta transzportját a fentiek szerint vizsgáltuk, kisebb változtatásokkal. A sejteket a kísérlet előtt 24-lyukú lemezre ültettük 400000 sejt/lyuk denzitásban. Az előkísérletekben a baikalint két koncentrációban (1 és 10 µM)

alkalmaztuk, 2 és 20 percig inkubáltunk. Megbecsültük a baikalin transzport kinetikai paramétereit, idő- és koncentrációfüggés kísérletekben. OATP2B1 transzport kísérletekben 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 és 45 percig inkubáltunk a baikalinnal. A transzport 5 percig volt lineáris, így a koncentrációfüggést 3 perces inkubációs idővel végeztük, a baikalint 1-100 μM végkoncentrációban alkalmaztuk. A baikalin OATP1B3-mediálta transzportját 60 percig mértük, 8 időpontban. A baikalin koncentrációfüggő transzportját e transzporter esetén 45 percig mértük, az akkumulációt 21,09 - 2700 μM tartományban vizsgáltuk. A kísérleteket hideg KH-pufferrel állítottuk le, majd kétszeri mosást követően feltártuk a sejteket 2:1 metanol:víz elegyével. A lemezeket 4°C-on, 20 percig inkubáltuk, majd centrifugáltuk (10 perc, 5000 g). A felülúszót átszedtük és beszárítottuk. A mintákat LC-MS/MS analízis előtt eluensben vették fel, a sejtekbe akkumulálódott baikalin mennyiségét Magda és munkatársai által (196) leírtak szerint határozták meg. A sejtek teljes fehérje tartalmát BCA esszével határoztuk meg.

A gyógyszerek OATP-mediálta (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1) fluoreszcens szubsztrát transzport gátlását A431 sejtekben vizsgálták. A sejtvonalak létrehozásának metodikáját és az esszék részleteit korábbi publikációkban írták le (197-199), a metodikai részleteket jelen disszertációban nem mutatom be. A kísérleti paramétereket a 3. táblázat foglalja össze. A mérés lényege: 96-lyukú szövettenyésztő lemezre ültetett adott OATP-t expresszáló és kontroll A431 sejteket 5 percig előinkubálták pufferben a vizsgálandó anyagok növekvő koncentrációjú hígítási soraival vagy csak DMSO-val 37°C-on. A preinkubálást követően indították a koinkubálást piranin vagy sulforodamin 101 szubsztrát és a gyógyszerek hígítási sorait tartalmazó pufferben 37°C-on. A reakció leállítása után mérték a sejtekben felhalmozódott fluoreszcens szubsztrátok intenzitását fluoriméterrel. Az OATP-dependens transzportot a kontroll sejteken mért háttérfluoreszcencia kivonásával határozták meg.

4.6. ABCB4-expresszáló sejtvonala és transzcelluláris esszék

Az MDCKII sejtvonalaiban kifejeződő *Abcb1* gén kiütését CRISPR/Cas9 rendszerrel a GenScript végezte. Az elkészült klónokat felszaporították, genomi DNS-t izoláltak, a genomi DNS-ek minőségét PCR segítségével, a PCR terméket Sanger szekvenálással ellenőrizték

(Genscript). A szekvencia-ellenőrzött ABCB4 cDNS-t szintén a GenScript szintetizálta és klónoztta. Az MDCKII-Abcb1 biallélikus knockout klónt a SOLVO Biotechnológiai ZRt. laboratóriumában karakterizáltuk. Az endogén Abcb1 expresszió hiányát több módszerrel ellenőriztük (áramlási citometriás calcein esszé, célzott proteomikai és transzcelluláris transzport mérés).

2×10^6 MDCKII vad típusú és Abcb1KO-MDCKII sejtet tripszin kezelés után PBS-sel mostuk. Centrifugálást (3 perc, 1000 g) követően a sejteket 500 μ l PBS-ben felvettük és 1 μ M CAM hozzáadása után 30 percet inkubáltuk 37 °C-on. A sejteket PBS-sel mostuk, centrifugálás után 500 μ l hideg PBS-ben felvettük és az áramlási citometriás vizsgálatig jégén tartottuk. Az áramlási citometriás méréseket Dr. Várady György végezte.

Az endogén Abcb1 hiányát tömegspektrometrián alapuló kvantitatív proteomikai vizsgálatokban is ellenőrizték a Szegedi Tudományegyetemen a Dr. Janáky Tamás Professzor Úr vezette NeuroProteomikai és Lipidomikai Laboratóriumban.

Az ABCB4-et tartalmazó lentivírus partikulumokat HEK293 sejtekben hoztam létre. Az Abcb1KO-MDCKII sejteket transzdukáltam. A transzdukált és antibiotikum-szelektált heterogén sejtpopulációból úgy hígítottam a sejteket, hogy a 96-lyukú sejtenyésző lemez minden lyukába átlagosan egy sejt jusson. Felszaporítás után a monoklónok funkcionális tesztjét transzcelluláris esszében végeztem. Egy kiválasztott klónból (D12) sejtbankot hoztunk létre és a további vizsgálatokat az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4-D12 sejtvonalon folytattuk.

Az ABCB4 fehérje expresszióját RT-PCR és Western blot segítségével ellenőriztük. Az Abcb1KO-MDCKII-Mock és Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 sejtekből TRIzol reagenssel teljes RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatásai alapján. A reverz transzkripciót és a TaqMan PCR-eket (ABCB4 esszé azonosító Hs00240956_m1) a gyártó instrukciói alapján végeztük (Invitrogen/ThermoFisher, Waltham, MA). Belső kontrollként kutya Gapdh (esszé azonosító Cf04419463_gH) gént használtuk. Az ABCB4-specifikus mRNS-t normalizáltuk a Gapdh mRNS-re.

A Western blothoz a sejteket tripszin kezelés után összegyűjtöttük, 1x PBS-sel mostuk, centrifugáltuk (3 min, 1000 g). A pelletet proteáz inhibitor tartalmozó lízispufferben felvettük. A teljes fehérje mennyiséget BCA reagenssel határoztuk meg a gyártó utasításai alapján. A mintákat azonos összfehérje mennyiséggel 4-15 %-os SDS-poliakrilamid grádiens gélen futtattuk meg. A fehérjét a gélből elektroblottoltuk PVDF (Millipore) membránra. A membránokat 5%-os sovány tejporos TBS-Tween oldatban 1 órán át blokkoltuk, majd 4 °C-on inkubáltuk ebben a blokkolóban 1:1000 hígított monoklonális egér anti-humán ABCB4 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, sc-58221) egy éjjelen át. Az ezt követő mosási lépések után a membránt HRP-konjugált másodlagos antitesttel (anti-egér HRP, 1:2000, ThermoFisher, # 62-6520) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 óráig. Mosásokat követően az antigén-antitest kölcsönhatást ECL reagenssel (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, #32106) hívtuk elő és a jelet BioRad ChemiDoc készülékkel detektáltuk.

Az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 és kontroll sejteket a HEK293 sejtekkel megegyező médiumban és körülmények közt tartottuk. A kultúrákat hetente háromszor passzáltuk 70-80%-os konfluenciánál. A transzport kísérletekhez magas pórusú denzitású, 0,4 µm pórusméretű polikarbonát (PC) 24- vagy 96-lyukú Millicell sejtenyésztő inerte lemezekre (PSHT010R5, PSHT004R5; Merck-Millipore) ültettük őket 150000 sejt/lyuk (0,7 cm² felület) vagy 25000 sejt/lyuk (0,11 cm²) denzitásban. A differenciálódott sejteken 5 nap elteltével végeztünk kísérleteket. A méréseket HBSS-ben folytattuk 37°C-on. Az apikális kompartmentben alkalmazott térfogat 0,4 ml, a bazolaterálisban 0,8 ml volt 24-lyukú lemezek esetén, a 96-lyukú lemezekben ugyanez 0,125/0,25 ml. Radioaktívan jelölt szubsztrátok vizsgálatánál a hideg anyagot lyukanként 0,1 µCi-nyi nyomjelző izotóppal egészítettük ki. A kísérletek előtt a sejteket kétszer mostuk előmelegített HBSS-sel, majd az elkészített szubsztrátoldatot vagy az apikális kamrába (A-B irányú transzport) vagy a bazolaterális kamrába (B-A irányú transzport) pipettáztuk, a szemközti fogadó kamrába puffert adtunk. Minden kondíciót három technikai párhuzamosban mértünk. Transzport gátlás méréseknél az inhibitor mind a két kompartmentben alkalmaztuk. A fogadó kamrából meghatározott időközönként mintát vettünk, a kivett térfogatot előmelegített pufferrel pótoltuk vagy a kísérletet 180 percig végeztük. A mérés végén minden kamrából mintát vettünk és anyagmérleget számoltunk. A radioaktívan jelzett minták detektálása az

uptake esszéknél leírtak szerint történt, egyéb vegyületek detektálása LC-MS/MS módszerrel. Az egysejtreg integritását 40 µg/ml Lucifer Yellow oldat permeabilitásának vizsgálatával ellenőriztük, a mintákban a fluoreszcenciát fluoriméterrel mértük. Az ABCB4 gyógyszerek általi gátlásának vizsgálatára alkalmas transzcelluláris esszét digoxinnal mint próbaszubsztráttal validáltuk. A fenti módon elvégeztük az ABCB4-mediálta digoxin transzport időfüggő vizsgálatát, az így kiválasztott időpontnál telítettük a digoxin transzportot. Az eredmények birtokában a gátlás kísérleteket már 1 µM digoxinnal 180 percnyi inkubálással végeztük.

4.7. Adatok értékelése, kalkulációk

Minden kísérletet két vagy három technikai párhuzamosban, három ismétléssel végeztünk. A mérési eredményeket átlagoltuk Microsoft Excel szoftverrel, a különbségeket az átlag standard hibájával jellemeztük. A korábban leírtaknak megfelelően transzporter specifikus aktivitást számoltunk, majd a gátlás esszéknél normalizáltunk az oldószer kontroll értékekre. Az IC₅₀ értékeket nem-lineáris regressziós modell alkalmazásával Prism (Prism 9.1, GraphPad) vagy Origin2019 (OriginLab) szoftverekkel határoztuk meg.

A látszólagos permeabilitás értékeket a következő képlet alapján számoltuk:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dT} \times \frac{1}{A \times C_0},$$

ahol a dQ a transzportált anyag mennyiségét jelenti (pmol), a dT az inkubációs idő (szekundum), A a polikarbonát membrán felülete (cm²), C₀ az anyag kezdeti koncentrációja a donor kamrában. Mértékegysége: 10⁻⁶ cm/szekundum. A szekretórikus permeabilitás és az abszorptív permeabilitás értékeinek hányadosa (P_{app} BA/P_{app} AB) adja meg az anyag efflux hányadosát (ER).

A vizsgált anyagok potenciális in vivo hatásának becslésére a Nemzetközi Transzporter Konzorcium (ITC) és FDA irányelvei szerint R értéket (OATP1B1, OATP1B3) vagy C_{max}/in vitro IC₅₀ (hepatikus, renális ABCB1, ABCG2) értékeket kalkuláltunk, ahol a C_{max} a vizsgált vegyület maximális plazmakoncentrációja.

Az R érték definíció szerint $1 + (f_u \times I_{in, max}/IC_{50})$, ahol $I_{in, max}$ a májba bejutó gyógyszer becsült maximális koncentrációja. Ezt számolhatjuk, $I_{in, max} = C_{max} + (k_a \times Dózis \times FaFg)/Q_h/RB$ képlet segítségével, ahol a C_{max} a maximális szisztémás plazmakoncentráció, K_a az abszorpció s r áta konstans. $k_a = 0,1/$ perc értéket szokás a legkedvezőtlenebb forgatókönyv szerinti konstansnak definiálni. F_a felszívódott frakció, a legrosszabb forgatókönyv szerinti értéke 1. F_g az anyag intesztinális elérhetősége, legrosszabb esetben értéke 1. A Q_h a májon percnként átáramló artériás vér mennyiségét jelenti, számításainkhoz 1500 ml/perc-et használtunk. 1-nek vettük az RB-t, ami a vér-plazma aránynak felel meg.

Szájon át alkalmazott gyógyszerek intesztinális ABCB1 és ABCG2 kölcsönhatásának in vivo relevanciájának becslésére az alábbi módszert alkalmaztuk:

$[I]_2 / IC_{50} \geq 10$, ahol $[I]_2$ az enterociták apikális oldalán (luminális) a maximális gyógyszer dózisból 250 ml térfogatban számolt várható maximális koncentráció, IC_{50} az in vitro medián gátlási koncentráció.

5. Eredmények

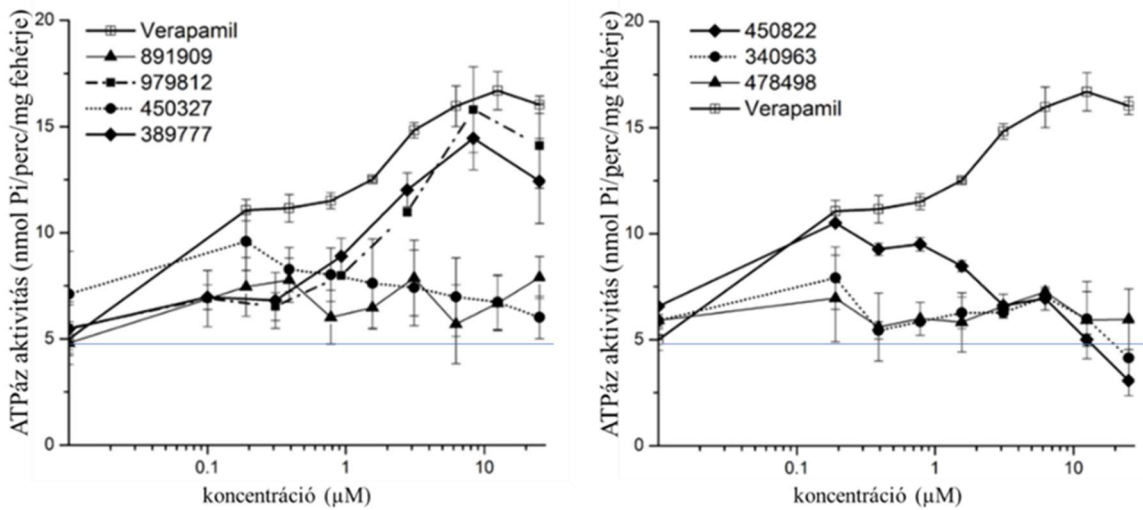
5.1. Az újonnan fejlesztett potenciális antituberkulotikumok, MtTopo-I inhibitorok transzporter kölcsönhatás vizsgálatai

A gyógyszerrezisztencia kialakulása daganatos, autoimmun és fertőző betegségekben sokrétű probléma, komplexitása miatt nem lehet egy rezisztencia mechanizmussal jellemezni. Az intracelluláris *Mycobacterium tuberculosis* eradikálására használt szereket nagy dózisban és hosszabb távon alkalmazzák, növekszik a multidrog rezisztens esetek száma (200). Mivel a tuberkulózis kezelésére használt szerek és ABC transzporterek kölcsönhatása celluláris gyógyszerrezisztencia és ADMETox tulajdonságok változásához vezethet, megvizsgáltuk e vegyületek és a humán ABCB1 és ABCG2 fehérjék kölcsönhatását. A tesztanyagok ABC transzporterekre kifejtett hatását két különböző, egy membránalapú és egy sejtes esszében ellenőriztük.

ATPáz aktivitás méréseink során ABCB1 és ABCG2 fehérjét tartalmazó membránpreparátumokat használtunk, melyek rovarsejtes/bakulovírusos rendszerből származtak. A tesztanyagok alap ATPáz aktivitásra kifejtett hatása mellett ABCB1 (verapamil) és ABCG2 (kvercetin) szubsztrát indukálta ATPáz aktivitást is vizsgáltunk. ABC transzporter kölcsönhatás vizsgálataink mellett, illetve a közös munkát megelőzően kollaborációs partnereink a vegyületek MtTopo-I kötődését vizsgálták *in silico*, *in vitro* MtTopo-I enzim gátlás esszékkal párhuzamosan. Minden vegyület kötődhet az enzim tanulmányozott részéhez, két anyag, a VCC340963 és VCC450822 kломipraminhoz képest is kedvezőbb eredményt adott. Az összes vegyület teljesen gátolta az MtTopo-I aktivitását, 20 μM alatti koncentrációban. A legpotensebb MtTopo-I gátlóhatást a VCC450327 mutatta, már 0,1 μM koncentrációban. Három molekula, a VCC979812, VCC389777 és VCC450327 nem gátolta a baktérium szaporodását, a kalkulált MIC₉₀ értékek 0,6 és 10 μM közé estek, potenciájuk szerinti sorrendben: VCC478498, VCC340963, VCC450822 és VCC891909 (189).

Azt, hogy a tesztanyagok az ABCB1 és ABCG2 transzporterek vanadát-érzékeny ATPáz aktivitását hogyan módosították, a vegyületek 0,01-12,5 μM koncentrációtartományában mértük.

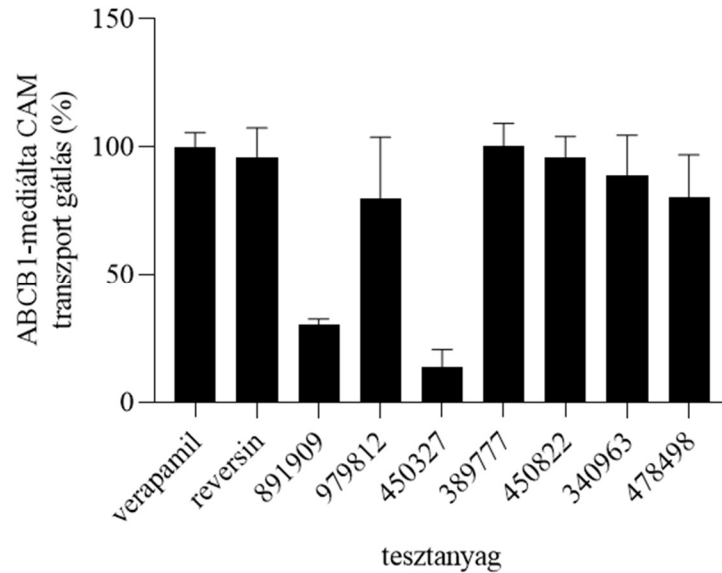
A VCC389777, VCC979812 és VCC450822 aktiválták az ABCB1 ATPázát, az aktiválás jelezheti, hogy ezek a vegyületek a transzporter szubsztrátjai. A VCC450822 alacsonyabb koncentrációknál mérve enyhén stimulálta, magasabb koncentrációban viszont erősen gátolta az ATPáz aktivitást, ez a mintázat tipikus a lassan transzportált szubsztrátokra vagy gátlószerekre (201). A többi vegyület a VCC340963, VCC450327, VCC891909 és a VCC478498 nem mutatott kölcsönhatást az ABCB1 ATPázal (2. ábra).



2. ábra: Antituberkulotikum-jelölt (MtTopoI inhibitor) vegyületek ABCB1 ATPáz moduláló hatása. Az ABCB1-Sf9 preparátumok ATPáz aktivitása aktiváló szubsztrát (verapamil) jelenlétében és kezelt mintákon ($n=3$, átlag \pm SD). A kezeletlen, csak szolvent tartalmazó ABCB1 ATPáz aktivitást az ábrán vízszintes kék vonal jelzi (202).

A gyógyszerfejlesztés korai fázisában közkedvelt a fluoreszcens próbák alkalmazása, így a gyógyszer-ABCB1 kölcsönhatásának kimutatására alkalmazott calcein esszében méréseket végeztünk ABCB1 expresszáló PLB sejtekkel, 0,1 μM CAM jelenlétében. Az MtTopo1-

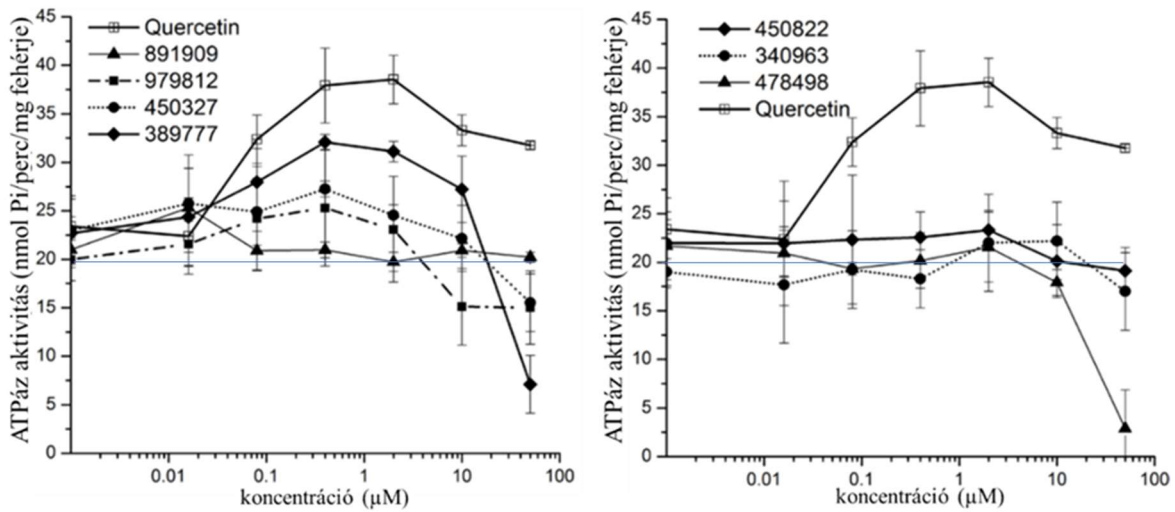
inhibitor vegyületek ABCB1 gátló hatását 5 μ M alkalmazott koncentrációnál vizsgáltuk. A hétből öt vegyület (VCC979812, VCC389777, VCC450822, VCC340963, VCC478498) potensen gátolta a calcein transzportot, a VCC891909 interakciós potenciálja pedig elmaradt a többi vegyületétől. Egy anyag, a VCC450327 nem hatott kölcsön az ABCB1 fehérjével calcein esszében (3. ábra).



3. ábra: M^tTopo-I inhibitorok hatása az ABCB1 transzporter transzport aktivitására.

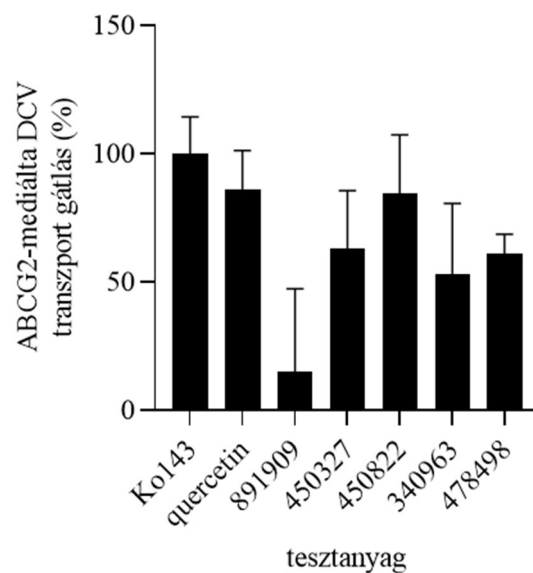
A válogatott Vichem anyagok ABCB1 transzportaktivitására kifejtett hatását ABCB1-PLB sejteken vizsgáltuk. A transzporterspecifikus CAM szubsztrát akkumulációját a tesztanyagok 5 μ M-os koncentrációja mellett vizsgáltuk. A tesztanyagok relatív gátlóhatását a maximális gátlóhatást kifejtő referencia anyagokhoz (20 μ M verapamil, 5 μ M reverzin) képest határoztuk meg (n=3, átlag \pm SD).

Az ABCG2 ATPáz aktiválást is vizsgáltuk a tesztanyagok koncentrációjának függvényében. Kizárólag a VCC389777 stimulálta szignifikánsan az ABCG2 vanadát-érzékeny ATPáz aktivitást, míg a többi vegyület, a VCC891909, VCC979812, VCC450327, VCC450822, VCC340963 és VCC478498 nem stimulálta azt (4. ábra).



4. ábra: Antituberkulotikum-jelölt (MtTopo-I inhibitor) vegyületek ABCG2 ATPáz moduláló hatása. Az ABCG2-Sf9 preparátumok ATPáz aktivitása aktiváló szubsztrát (kvercetin) jelenlétében és kezelt mintákon (n=3, átlag±SD). A kezeletlen, csak szolvent tartalmazó ABCG2 ATPáz aktivitást az ábrán vízszintes kék vonal jelzi (202).

A vegyületek ABCG2 kölcsönhatásának tesztelésére PLB alapú sejtes festéktranszport méréseket is végeztünk. A VCC891909 nem gátolta az ABCG2-mediálta DCV transzportot, a többi vegyület a VCC450327, VCC450822, VCC340963 és VCC478498 szignifikánsan gátolt 5 µM koncentrációban (5. ábra). A VCC979812 és VCC389777 anyagokat autofluoreszcenciájuk miatt áramlási citometriával, mitoxantron efflux gátlás mérésével kellett vizsgálnunk. Mindkét anyag potens gátlószernek bizonyult, az ABCG2-PLB sejtekben szignifikánsan nőtt a mitoxantron felvétel.



5. ábra: MtTopo-I inhibitorok hatása az ABCG2 transzporter transzport aktivitására.

A válogatott Vichem anyagok ABCG2 transzportaktivitására kifejtett hatását ABCG2-PLB sejteken vizsgáltuk. A transzporterspecifikus DCV szubsztrát akkumulációját a tesztanyagok 5 μ M-os koncentrációja mellett mértük. A tesztanyagok relatív gátlóhatását a maximális gátlóhatást kifejtő referencia anyagokhoz (5 μ M Ko143, 5 μ M kvercetin) képest határoztuk meg (n=3, átlag \pm SD) (202).

5.2. COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek DDI rizikójának meghatározása

Tanulmányoztuk a klorokin, a hidroxiklorokin, az ivermektin, a lopinavir, a ritonavir, a remdezivir és a favipiravir kölcsönhatásait az alábbi transzporterekkel: ABCB1, ABCG2, ABCC1, OATP1A2, OATP2B1 (intesztinális barrier és vér-agy gát) ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCB11, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, OCT1 és NTCP (hepatikus barrier).

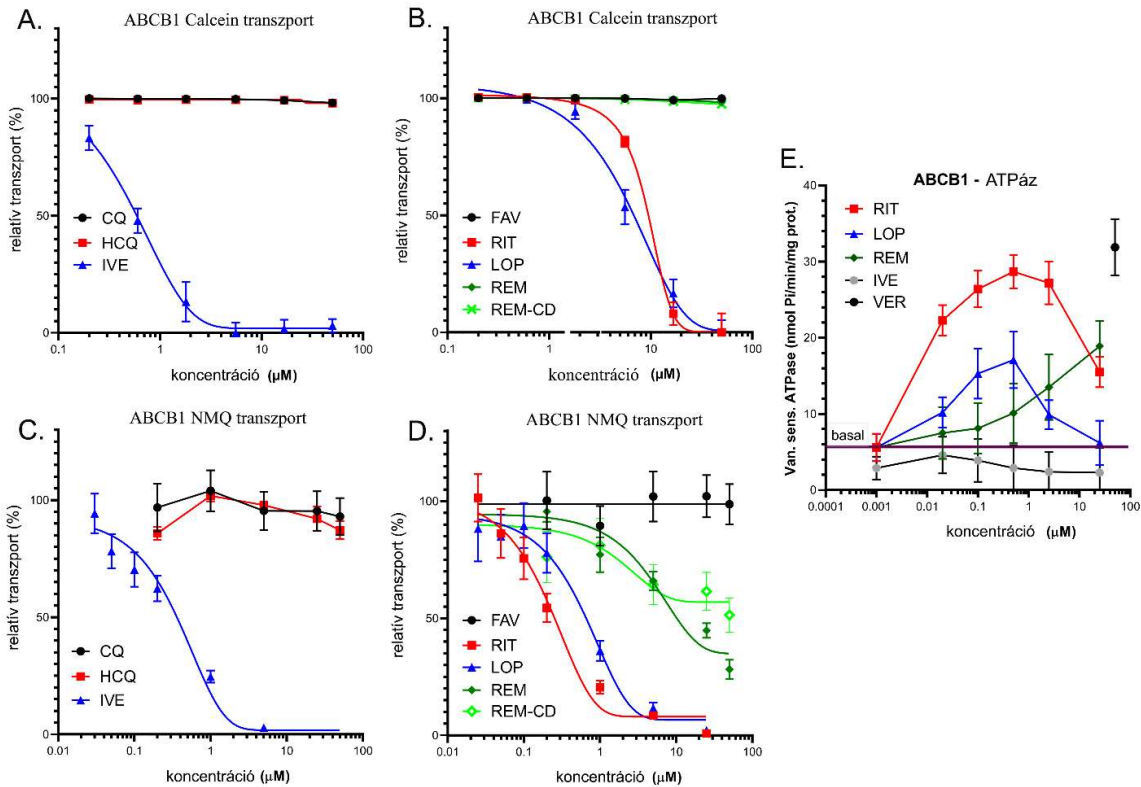
Munkánk során különböző komplexitású - barrierspecifikus transzporterek vizsgálatát lehetővé tévő - módszereket alkalmaztunk.

A gyógyszerek és ABCB1 transzporter kölcsönhatását membránalapú (ATPáz és VT) és sejtes festéktranszport (ABCB1-PLB) esszéekben vizsgáltuk.

A kísérleti eredmények azt mutatták ABCB1-Sf9 membránpreparátumokon, hogy a ritonavir képes már alacsony, 0,1 μM -nál kisebb EC_{50} értékkel a pozitív kontroll verapamil ATPáz aktiváló hatását elérni. Mind a lopinavir (EC_{50} 0,05 μM), mind a remdesivir (EC_{50} 10 μM) szignifikánsan stimulálták az ABCB1 ATPáz-t. A ritonavir és lopinavir magasabb koncentrációban gátolták az ATPáz aktivitást. Az ivermektin nem fokozta az ABCB1 ATPáz aktivitást, inkább gátolta, de az ABCB1 relatíve alacsony ATPáz alapaktivitása esetén a hatás karakterisztikája nem kivehető.

ABCB1 overexpresszázó HEK293 sejtéből membránpreparátumot készítettünk, és vizsgáltam a gyógyszerek moduláló hatását a kifordított vezikulába történő ATP-függő NMQ transzporton. Gyógyszerek jelenléte nélkül az NMQ transzport 100%-nak vesszük, ehhez viszonyítva számoltam az ABCB1 50 %-os gátlásához tartozó inhibitor koncentrációt. Az ivermektin, lopinavir és ritonavir (IC_{50} 0,3; 0,6 és 0,3 μM) alacsony mikromólos koncentrációban gátolták az NMQ transzportot. A klorokin, hidroxiklorokin és favipiravir nem hatottak kölcsön az ABCB1 fehérjével ebben a tesztrendszerben. A remdezivir és a ciklodextrin-formulált remdezivir-SBECD nem bizonyultak potens gátlószereknek, 50% körüli maximális gátlást mutattak a legmagasabb alkalmazott, 50 μM -os koncentrációban.

Az ABCB1-PLB calcein esszében a kapott IC_{50} értékek sorrendjében a legpotensebb gátlószerek az ivermektin (IC_{50} 0,6 μ M), a lopinavir (IC_{50} 6,3 μ M) és ritonavir (8,4 μ M) bizonyultak. A klorokin, hidroxiklorokin, favipiravir, a remdezivir és a remdezivir-SBECD nem befolyásolták a calcein transzportot. Az ABCB1 kölcsönhatás vizsgálatok eredményeit a 6. ábrán foglaltam össze.



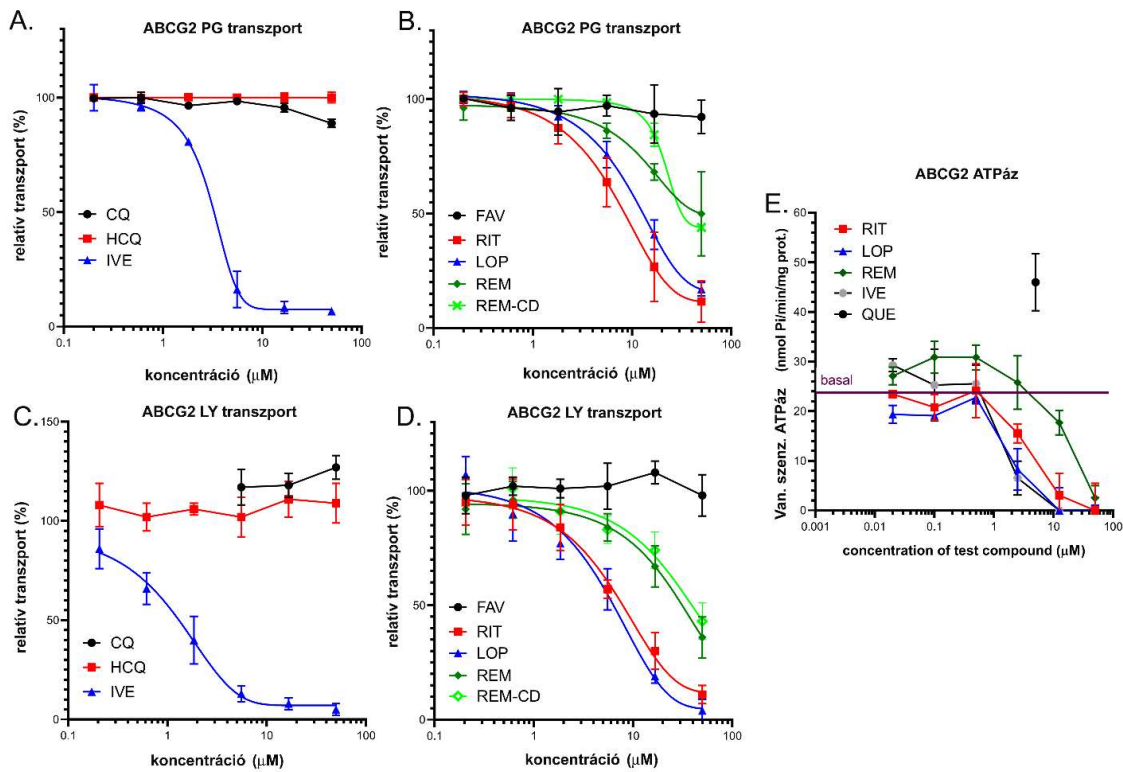
6. ábra: COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek kölcsönhatása az ABCB1 transzporterrel különböző kísérletes rendszerekben. A gyógyszerek ABCB1 transzportaktivitására kifejtett hatását ABCB1-PLB sejteken vizsgáltuk. (A és B) A transzporterspecifikus CAM szubsztrát akkumulációját a tesztanyagok különböző koncentrációi mellett vizsgáltuk. (C és D) A gyógyszerek növekvő koncentrációja mellett vizsgáltam az NMQ akkumulációját HEK293-ABCB1 membránvezikulákba. (E) Az ABCB1-Sf9 preparátumok ATPáz aktivitása aktiváló szubsztrát (verapamil) jelenlétében és kezelt mintákon. A kezletlen, csak szolvenst tartalmazó ABCB1 ATPáz aktivitást az ábrán a basal feliratú vízszintes vonal jelöli (n=3, átlag±SD). A relatív transzport (%) értékeket a maximális transzporter aktivitáshoz képest határoztuk meg. Az egyes gyógyszerekhez tartozó görbéket: klorokin (CQ), hidroxiklorokin (HCQ), ivermektin (IVE), favipiravir (FAV), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), remdezivir (REM) és remdezivir-SBECD (REM-CD) az ábrán jelöltem jelmagyarázatban (203).

ABCG2 fehérjét expresszáló Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz kísérletekkel igazoltuk, hogy a vizsgált anyagok egyike sem aktiválja az ABCG2 ATPáz. Az ivermektin, ritonavir és lopinavir koncentrációfüggően gátolták az ABCG2 vanadátfüggő ATPáz aktivitását, a remdezivir csak magasabb koncentrációban gátolta ugyanezt (7. ábra, E).

ABCG2-HEK293 sejtől készített membránvezikulákon vizsgáltuk a gyógyszerek LY transzportra gyakorolt hatását. A klorokin, hidroxiklorokin és favipiravir nem gátolták a LY transzportját. Az ivermektin, lopinavir és ritonavir gátolták a LY transzportot, a referencia gátlószer, Ko143 okozta teljes gátláshoz viszonyítva kalkuláltuk a 7. ábrán (C és D) bemutatott koncentrációfüggő gátláshoz tartozó IC₅₀ értékeket (1,1; 4,2 és 7,5 μM). A remdezivir és remdezivir-SBECD kalkulált IC₅₀ értékei hasonló koncentrációtartományba (~ 50 μM) esnek.

A PhenGreen esszében, amit ABCG2-PLB sejteken végeztünk, az ivermektin a Ko143 okozta teljes gátláshoz képest 3,1 μM IC₅₀ értékkel gátolta az ABCG2-mediálta PG-DA transzportját. A lopinavir és ritonavir is gátolta a PG-DA transzportot azonos nagyságrendbe eső IC₅₀ értékekkel (13,1 és 8,3 μM). A remdezivir és komplex formája a legmagasabb, 50 μM-os alkalmazott koncentrációban is csak 50 % körüli gátlóhatást fejtettek ki. A klorokin, hidroxiklorokin és a favipiravir nem mutattak kölcsönhatást az ABCG2 fehérjével ebben a rendszerben vizsgálva sem (7. ábra, A és B).

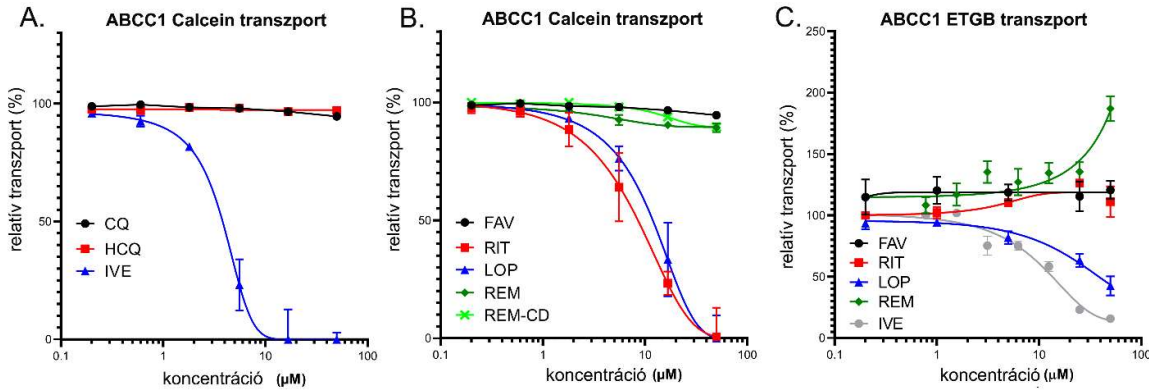
Az ABCG2 transzporterre gátló hatást kifejtő gyógyszereket tovább vizsgáltuk Hoechst 33342 transzport gátlás esszéiben áramlási citometriás módszerrel vad típusú ABCG2- és Q141K-ABCG2 variánst kifejező HeLa sejteken. A Q141K-ABCG2 variánst kifejező HeLa sejtek érzékenyebbek voltak a gyógyszerek okozta gátlásra. Az ivermektin, lopinavir és ritonavir gátolták a Hoechst transzportot, a remdezivir csak magas koncentrációban mutatott kölcsönhatást.



7. ábra: COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek kölcsönhatása az ABCG2 transzporterrel különböző kísérletes rendszerekben. A gyógyszerek ABCG2 transzportaktivására kifejtett hatását ABCG2-PLB sejteken vizsgáltuk. (A és B) A transzporterspecifikus PG-DA akkumulációját a tesztanyagok különböző koncentrációi mellett vizsgáltuk. (C és D) A gyógyszerek növekvő koncentrációja mellett vizsgáltuk a LY akkumulációját HEK293-ABCG2 membránvezikulákba. (E) Az ABCG2-Sf9 preparátumok vanadát-függő ATPáz gátlása aktiváló szubsztrát (kvercetin) jelenlétében és kezelt mintákon. A kezeletlen, csak szolvenst tartalmazó ABCG2 ATPáz aktivitást az ábrán basal felíratú vízszintes vonal jelöli (n=3, átlag±SD). A relatív transzport (%) értékeket a maximális transzporter aktivitáshoz képest vagy referencia gátlószerhez (Ko143, PG-transzport) határoztuk meg. Az egyes gyógyszerekhez tartozó görbéket: klorokin (CQ), hidroxiklorokin (HCQ), ivermektin (IVE), favipiravir (FAV), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), remdezivir (REM) és remdezivir-SBECD (REM-CD) az ábrán jelöltük jelmagyarázatban (203).

Az ABCC1 gátlást is vizsgáltam Sf9 preparátumokon VT esszében. Az ABCC1-mediálta ETBG transzport gyógyszerek jelenléte nélkül 100%, ehhez viszonyítva meghatároztam az egyes droggkoncentrációkhoz tartozó gátlási értékek ábrázolásával az adott vegyület IC_{50} értékét. Az ivermektin (IC_{50} 13,3 μ M) és lopinavir (IC_{50} 10 μ M) koncentrációfüggően gátolták az ETBG ATP-függő transzportját. A klorokin, hidroxiklorokin, ritonavir és favipiravir nem hatottak kölcsön az ABCC1 fehérjével ebben a tesztrendszerben. A remdezivir magasabb koncentrációban stimulálta az ABCC1-mediálta szubsztráttranszportot (8. ábra).

A CAM nemcsak az ABCB1, hanem az ABCC1 nagy affinitású szubsztrátja is. 10 μ M indometacin teljesen gátolja az ABCC1-mediálta CAM transzportot ABCC1-HL60 sejtekben, ehhez viszonyítva az ivermektin (IC_{50} 3,3 μ M), a lopinavir (IC_{50} 10,7 μ M) és ritonavir (IC_{50} 7,7 μ M) is gátolták a CAM transzportot. Sem a klorokin, hidroxiklorokin, sem a favipiravir, remdezivir és komplexe nem hatottak kölcsön az ABCC1 transzporterrel a calcein esszében (8. ábra).



8. ábra: COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek kölcsönhatása az ABCC1 transzporterrel különböző kísérletes rendszerekben. A gyógyszerek ABCC1 transzportaktivitására kifejtett hatását ABCC1-HL60 sejteken vizsgáltuk. (A és B) A transzporterspecifikus CAM akkumulációját a tesztanyagok különböző koncentrációi mellett vizsgáltuk. (C) A gyógyszerek növekvő koncentrációja mellett vizsgáltuk az ETGB akkumulációját Sf9-ABCC1 membránvezikulákba. A relatív transzport (%) értékeket a maximális transzporter aktivitáshoz képest határoztuk meg. ($n=3$, átlag \pm SD). Az egyes gyógyszerekhez tartozó görbéket: klorokin (CQ), hidroxiklorokin (HCQ), ivermektin (IVE), favipiravir (FAV), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), remdezivir (REM) és remdezivir-SBECD (REM-CD) az ábrán jelöltük jelmagyarázatban (203).

A továbbiakban vizsgáltuk a vegyületek uptake transzporterekre gyakorolt hatását. Az OATP1A2 mediálta sulforodamin felvételét a favipiravir kivételével mindegyik vegyület gátolta. A lopinavir, ritonavir, remdezivir és komplexe és az ivermektin alacsony mikromólos koncentrációban gátolta az OATP1A2 működését. Klorokin és hidroxiklorokin esetén magasabb IC_{50} értékeket kaptunk. A gyógyszerek hasonló IC_{50} értékekkel gátolták az OATP2B1 expresszálo sejtekbe a piranin felvételét, míg a klorokin és hidroxiklorokin a legmagasabb alkalmazott koncentrációban 75%-ig gátolták a transzportot. Eredményeinket a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: A COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek ABCB1, ABCG2, ABCC1 és OATP transzporterekre meghatározott IC₅₀ értékeinek összefoglalása. Az IC₅₀ értékeket nem lineáris regresszióval határoztuk meg (203).

Gyógyszer	IC ₅₀ (μM)							
	ABCB1		ABCG2		ABCC1		OATP	
	CAM	VT	PG	VT	CAM	VT	1A2	2B1
Klorokin	-	-	-	-	-	-	17	119
Hidroxiklorokin	-	-	-	-	-	-	18,9	84
Ivermektin	0,6	0,3	3,1	1,1	3,3	13,3	5,2	8,6
Lopinavir	6,3	0,6	13,1	4,2	10,7	10	1,5	1,0
Ritonavir	8,4	0,3	8,3	7,5	7,7	-	2,3	1,4
Remdezivir	-	>20	>50	>50	-	-	3,8	3,8
Remdezivir-SBEC	-	>20	>50	>50	-	-	6,1	5,6
Favipiravir	-	-	-	-	-	-	-	-

A továbbiakban a COVID-19 gyógyszerek hepatikus eliminációjában kulcsszerepet játszó efflux és uptake transzporterekre kifejtett hatását vizsgáltuk. A klorokin és hidroxiklorokin e transzporterekre kifejtett esetleges moduláló hatását nem vizsgáltuk.

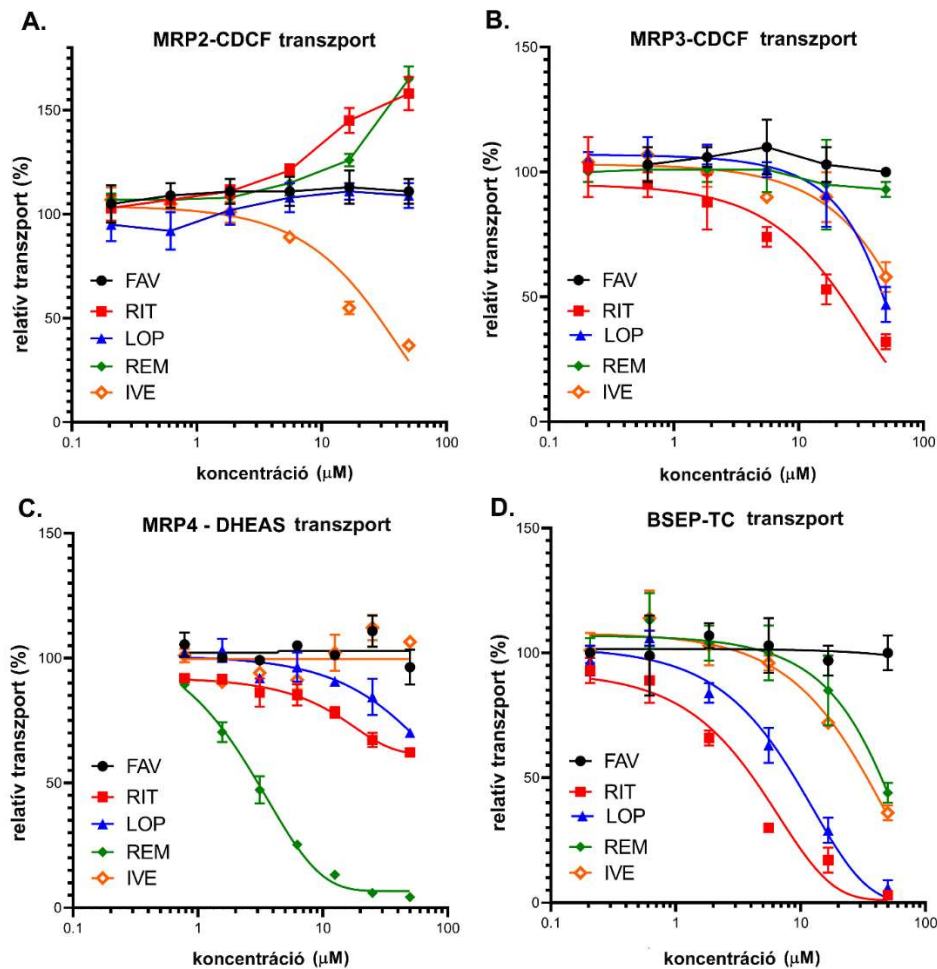
Az efflux transzporter-gyógyszer kölcsönhatást membránvezikula preparátumokon, vezikuláris transzport gátlás esszéiben vizsgáltuk. Az ABCC3 (MRP3), ABCC4 (MRP4) és ABCB11 (BSEP) fehérjék vizsgálatát az adott transzportert túltermelő HEK293 sejtekből készített, az ABCC2 (MRP2) vizsgálatát ABCC2-Sf9 sejtekből előállított membránokon végeztük.

Az ABCC2-mediálta CDCF transzportot az ivermektin gátolta, a lopinavir nem hatott kölcsön, magasabb koncentrációban a ritonavir a remdezivirhez hasonlóan potenciózta az ABCC2-t. A redukált glutation kotranszportja befolyásolhatja az ABCC2 működését, így a kísérleteket 2 mM glutation jelenlétében is elvégeztük. Nem tapasztaltunk eltérést a két mérés eredményei közt. A ritonavir, a lopinavir és az ivermektin gátolta a CDCF akkumulációját

ABCC3 fehérje tartalmú vezikulákba, a remdezivir az ABCC3-mediálta CDCF akkumulációját nem gátolta.

A remdezivir potensen gátolta a DHEAS transzportját az ABCC4 fehérjét tartalmazó vezikulákba, az ivermektin nem hatott kölcsön, a lopinavir és a ritonavir enyhe moduláló hatást fejtettek ki. A ritonavir és a lopinavir potensen gátolták az ABCB11 működését, míg az ivermektin és remdezivir a legmagasabb, 50 μ M-os koncentrációban 60 %-ban gátolták a TC akkumulációját ABCB11-HEK293 vezikulákba. A favipiravir egyik efflux transzporter működését sem befolyásolta.

A hepatikus efflux transzporter gátlás esszék eredményeit a 9. ábra és az 5. táblázat összegezi.



9. ábra: A favipiravir, ritonavir, lopinavir, remdezivir és ivermektin hatása a transzporterspecifikus szubsztrát akkumulációra VT esszében. (A) ABCC2-mediálta ATP-dependens CDCF transzport gátlása ABCC2-Sf9 vezikulákba. (B) ABCC3-mediálta ATP-dependens CDCF transzport gátlása ABCC3-HEK293 vezikulákba. (C) ABCC4-mediálta ATP-dependens DHEAS transzport gátlása ABCC4-HEK293 vezikulákba. (D) ABCB11-mediálta ATP-dependens TC transzport gátlása BSEP-HEK293 vezikulákba. A relatív transzport (%) értékeket a maximális transzporter aktivitáshoz képest határoztuk meg. (n=3, átlag±SD). Az egyes gyógyszerekhez tartozó görbéket: favipiravir (FAV), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), remdezivir (REM) és ivermektin (IVE) az ábrán jelöltük jelmagyarázatban (204).

5. táblázat: A COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek ABCC2, ABCC3, ABCC4 és ABCB11 transzporterekre meghatározott IC₅₀ értékeinek összefoglalása. Az IC₅₀ értékeket nem lineáris regresszióval határoztuk meg. (204)

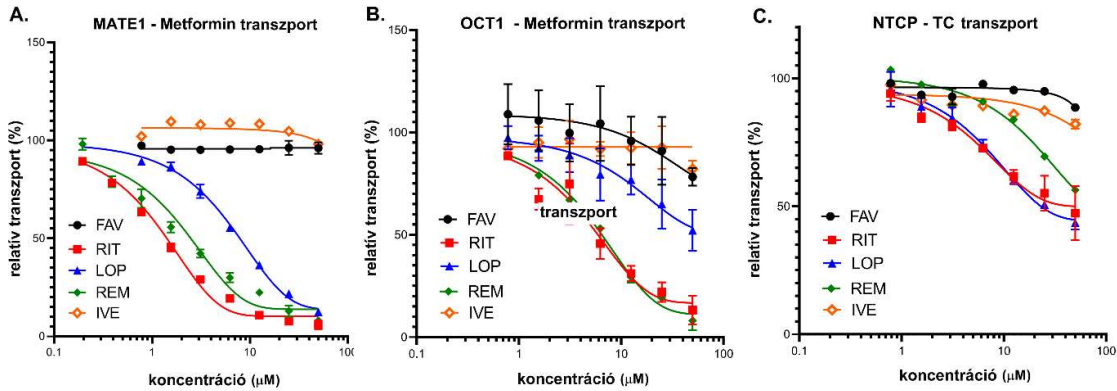
Gyógyszer	IC ₅₀ érték (µM)			
	ABCC2	ABCC3	ABCC4	ABCB11
Favipiravir	-	-	-	-
Ritonavir	Pot.	17	2,9	3,2
Lopinavir	-	>40	-	7,8
Remdezivir	Pot.	-	-	>40
Ivermektin	>20	>50	-	>30

A MATE1 transzporter egyaránt működhet efflux vagy uptake transzporterként. Munkám során a gyógyszerek MATE1-mediálta metformin felvételére kifejtett hatását vizsgáltam. A metformin transzport gátlásának koncentrációfüggését MDCKII-MATE1 és MDCKII kontroll sejteken végeztem. A ritonavir és remdezivir potensen gátolták a metformin akkumulációját, a lopinavir kevésbé potens gátlószernek bizonyult. A favipiravir és ivermektin nem hatottak kölcsön a MATE1 fehérjével ebben a kísérleti rendszerben.

HEK293-OCT1 és HEK293 kontroll sejteken mértem a metformin akkumulációját gyógyszerek jelenlétében vagy hiányában. A MATE1 mérésekhez hasonló gátlásprofilot kaptunk a ritonavir és a remdezivir esetén, a lopinavir kölcsönhatás elhanyagolható, hisz a legmagasabb koncentrációban is csak 50% gátló hatást fejtett ki a metformin transzportjára. A favipiravir és ivermektin az OCT1 transzporterrel sem hatottak kölcsön.

A HEK293-NTCP és HEK293 kontroll sejtekben akkumulálódó TC mennyiségét a lopinavir, a ritonavir és a remdezivir koncentrációfüggően csökkentették, de a legmagasabb, 50 µM-os koncentrációban is csak 50% körüli gátló hatást fejtettek ki.

Eredményeink összefoglalását a 10. ábra mutatja be.



10. ábra: A favipiravir, ritonavir, lopinavir, remdezivir és ivermektin hatása a transzporterspecifikus szubsztrát akkumulációra uptake esszében. (A) MATE1-mediálta metformin akkumuláció gátlása. (B) OCT1-mediálta metformin akkumuláció gátlása. (C) NTCP-mediálta TC akkumuláció gátlása. A relatív transzport (%) értékeket a transzporter-specifikus maximális aktivitáshoz képest határoztuk meg. (n=3, átlag±SD). Az egyes gyógyszerekhez tartozó görbéket: favipiravir (FAV), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), remdezivir (REM) és ivermektin (IVE) az ábrán jelöltem jelmagyarázatban (204).

Vizsgáltuk a gyógyszerek OATP1B1- vagy OATP1B3-expresszáló A431 sejtekre kifejtett hatását is. Eredményeink azt mutatták, hogy a favipiravir kivételével az összes gyógyszer, tehát a lopinavir, a ritonavir, a remdezivir potensen gátolta a piranin transzportját. Az ivermektin az OATP1B3-mediálta piranin transzportját gátolta potensen, az OATP1B1 fehérje működését kevésbé befolyásolta.

A gyógyszerek uptake transzporterekre kifejtett hatását a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: A COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek MATE1, OCT1, NTCP, OATP1B1 és OATP1B3 transzporterekre meghatározott IC₅₀ értékeinek összefoglalása. Az IC₅₀ értékeket nemlineáris regresszióval határoztuk meg (204).

Gyógyszer	IC ₅₀ érték (μM)				
	MATE1	OCT1	NTCP	OATP1B1	OATP1B3
Favipiravir	-	-	-	-	-
Lopinavir	7,7	>50	>50	1,1	2,6
Ritonavir	1,4	5,9	>50	1,4	1,5
Remdezivir	2,3	6,1	>50	2,9	4,3
Ivermektin	-	-	-	>20	1,4

A gyógyszerek, gyógyszerjelöltek potenciális gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásának becslésére többféle módszert alkalmaznak. Ezek egyike az ITC által ajánlott mechanisztikus statikus, *in vivo*-*in vitro* extrapolációs megközelítés. A gyógyszerhatóságok a gyógyszer engedélyeztetés során többek közt az OATP1B1, OATP1B3, ABCB1 és ABCG2 fehérjék vizsgálatára tesznek javaslatot. Az *in vitro* gátlás eredményeink és a gyógyszerek irodalomban fellelhető plazmakoncentrációinak felhasználásával elvégeztük ezeket a becsléseket. Az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett képleteket alkalmaztuk, a részleteket és eredményeinket a 7. - 10. táblázatokban ismertetem.

7. táblázat: OATP1B1 és OATP1B3 transzporterek lopinavir és ritonavir kölcsönhatásának in vivo extrapolálására kalkulált R-érték. A táblázat összefoglalja az R-érték meghatározásához használt és kalkulált paramétereket is.

Lopinavir/ritonavir, OATP1B1 és OATP1B3				
C_{max}, mg/ml	Mol.tömeg, g/mol	f_{up}	Dózis, mg	FaFg
0,0098/0,0018	628,8/720,9	0,02/0,02	400/100	1
R_b	I_{max}, μmol/l	I_{max,u}; μmol/l	OATP1B1 IC₅₀, μM	OATP1B3 IC₅₀, μM
1	15,58/2,54	0,312/0,051	1,1/1,4	2,6/1,5
K_a, 1/min	Q_h, ml/min	I_{in,max}; mg/ml	I_{in,max}; μmol/l	R érték (OATP1B1/1B3)
0,1	1450	0,037/0,016	59,456/21,670	2,39/1,74

8. táblázat: ABCB1 és ABCG2 transzporterek lopinavir és ritonavir kölcsönhatásának in vivo extrapolálására kalkulált hányadosok. A táblázat összefoglalja a hányadosok meghatározásához használt és kalkulált paramétereket is.

Lopinavir/ritonavir, ABCB1 és ABCG2						
C_{max}, μM	ABCB1 μM	IC₅₀, μM	C_{max}/IC₅₀ (ABCB1)	ABCG2 μM	IC₅₀, μM	C_{max}/IC₅₀ (ABCG2)
11,2/1	0,6/0,3		18,67/3,33	4,2/7,5		2,66/0,13
Dózis (mg)	Mol.tömeg, g/mol	I₂ (μM)	[I₂]/IC₅₀ (ABCB1)	[I₂]/IC₅₀ (ABCG2)		
400/100	628,8/720,9	2544,53/554,83	4240,9/1849,4	605,84/73,98		

9. táblázat: Az OATP1B3 transzporter ivermektin kölcsönhatásának in vivo extrapolálására kalkulált R-érték. A táblázat összefoglalja az R-érték meghatározásához használt és kalkulált paramétereket is.

Ivermektin, OATP1B3				
C_{max}, mg/ml	Mol.tömeg, g/mol	f_{up}	Dózis, mg	FaFg
0,000081	875,1	0,07	12	1
R_b	I_{max}, μmol/l	I_{max,u}; μmol/l	OATP1B3 IC₅₀, μM	
1	0,093	0,006	1,4	
K_a, 1/min	Q_h, ml/min	I_{in,max}; mg/ml	I_{in,max}; μmol/l	R érték (OATP1B3)
0,1	1450	0,0009	1,038	1,05

10. táblázat: ABCB1 és ABCG2 transzporterek és ivermektin kölcsönhatásának in vivo extrapolálására kalkulált hányadosok. A táblázat összefoglalja a hányadosok meghatározásához használt és kalkulált paramétereket is.

Ivermektin, ABCB1 és ABCG2						
C_{max}, μM	ABCB1 μM	IC₅₀, μM	C_{max}/IC₅₀ (ABCB1)	ABCG2 μM	IC₅₀, μM	C_{max}/IC₅₀ (ABCG2)
0,046	0,3		0,17	1,1		0,047
Dózis (mg)	Mol.tömeg, g/mol	[I]₂ (μM)		[I]₂/IC₅₀ (ABCB1)	[I]₂/IC₅₀ (ABCG2)	
15	875,1	68,56		228,54	62,33	

A remdezivir gyorsan ürül (205), így csekély esély van rá, hogy klinikailag szignifikáns gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatást okozzon OATP1B1, OATP1B3, OCT1 és MATE1 transzporterek modulálásán keresztül. Érvényes forgalombahozatali engedélye alapján nem

releváns az OATP1B1 és OATP1B3 gátlás, így további klinikai vizsgálat nem szükséges az FDA álláspontja szerint. Ezek alapján nem kalkuláltunk R-értéket.

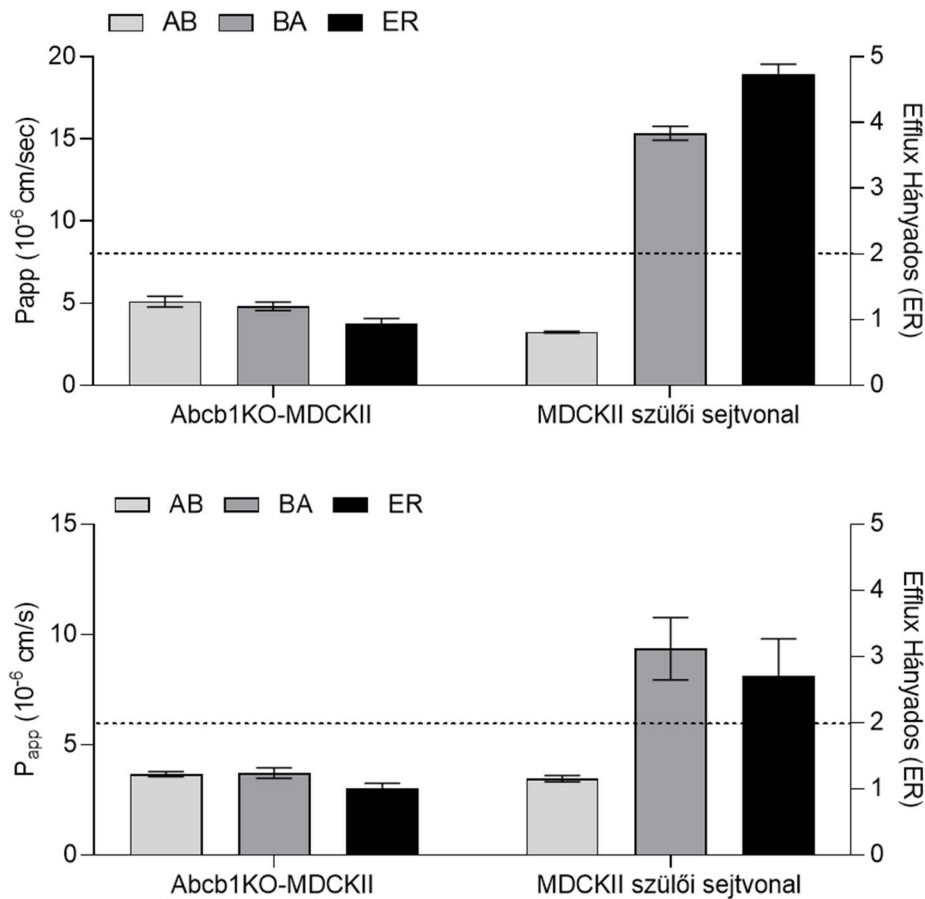
5.3. ABCB4 kölcsönhatás vizsgálatok eredményei, azonosított, irodalomban még nem leírt új gyógyszerszubsztrátok és gátlószerek

Célunk volt egy nem-májsejt alapú in vitro tesztrendszer fejlesztése ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatásának vizsgálatára. Az egy vagy akár több transzporter fehérjét túltermelő polarizált MDCKII sejtek a gyógyszer transzport vizsgálatok általános modelljei. A transzport vizsgálatok eredményeinek értelmezését megnehezítik az endogén transzporterek, elsősorban a kutya *Abcb1* fehérje. Számos megközelítést alkalmaznak az endogén transzporter hatás korrigálására, minimalizálására az alacsony kutya *Abcb1* expresszálo sejtek szelektálásán (206) át a cinkujj-nukleáz-bázisú kutya *Abcb1*-specifikus genomszerkesztésig (207). Ezekkel a módszerekkel még mindig marad kutya *Abcb1* aktivitás a sejtekben.

Mivel az ABCB4 76% azonosságot és 86% hasonlóságot mutat a humán ABCB1 fehérje aminosav szekvenciájával, strukturájuk is hasonló és mindkét fehérje expresszáloódik a hepatociták apikális membránjában, egy olyan MDCKII-alapú sejtesszét fejlesztettünk, amelyben nem expresszáloódik az endogén *Abcb1*, lehetővé téve csak az ABCB4 fehérje aktivitásának vizsgálatát.

Első lépésként megrendelésünkre a GenScript az MDCKII sejtvonalon kifejeződő *Abcb1* gén kiütését végezte el CRISPR/Cas9 rendszerrel. Az elkészült klónokat felszaporították, genomi DNS-t izoláltak, a genomi DNS-ek minőségét PCR segítségével, a PCR terméket Sanger szekvenálással ellenőrizték (Genscript). Az MDCKII-*Abcb1* biallélikus knockout klónt a SOLVO Biotechnológiai ZRt. laboratóriumában karakterizáltuk. Az endogén *Abcb1* expresszió hiányát több módszerrel ellenőriztük. A CAM-alapú áramlási citometriás vizsgálatokban nem tudtunk kutya *Abcb1* aktivitást detektálni. Kvantitatív proteomikai vizsgálatokban az MDCKII szülői sejtvonalon meghatározták a kutya *Abcb1* fehérje mennyiségét, míg az *Abcb1*KO-MDCKII sejtekben a fehérje a kimutatási határ alatt volt.

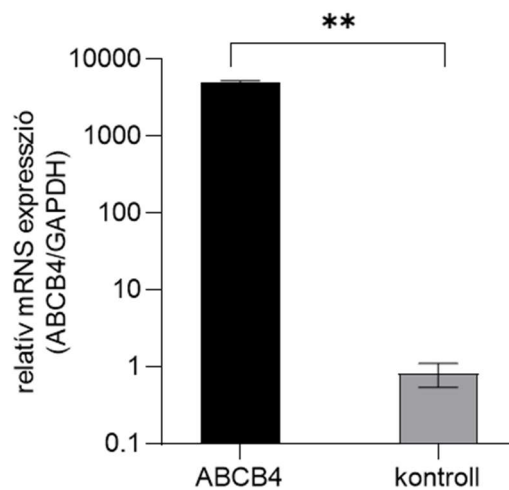
Az MDCKII szülői sejtvonalban az endogén kutya Abcb1 fehérje funkcióját ismert ABCB1 próbaszubsztrátokkal, többek közt digoxinnal és talinolollal igazolhatjuk. Az Abcb1KO-MDCKII sejtekben a kutya Abcb1 nem fejeződik ki, tehát transzport funkció sincs. Ennek ellenőrzésére vizsgáltuk a digoxin és talinolol vektoriális transzportját a polarizált sejt kultúrákon (11. ábra).



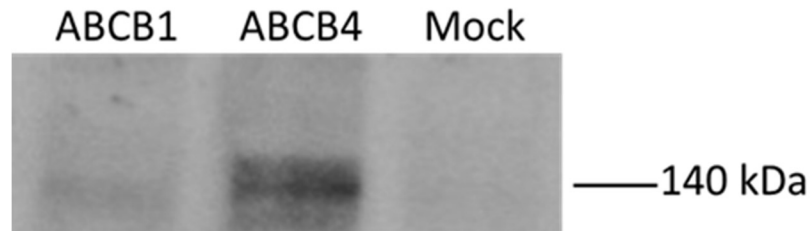
11. ábra: Digoxin és talinolol vektoriális transzportja Abcb1KO-MDCKII és MDCKII szülői sejtvonalakban. Felső panel: az 1 μ M digoxin látszólagos permeabilitás és efflux hányados értékei a két sejtvonalban. Alsó panel: az 1 μ M talinolol látszólagos permeabilitás és efflux hányados értékei a két sejtvonalban (n=3, átlag \pm SD) (208).

Endogén kutya *Abcb1* expresszió hiányában nem tudtuk detektálni a digoxin vagy talinolol kétirányú transzportját, az efflux hányados a KO sejtekben 2 alatt maradt. A szülői MDCKII sejtvonalban az endogén *Abcb1* fehérje mind a digoxin, mind a talinolol vektoriális transzportját végezte.

A következőkben lentivírusos transzdukcióval ABCB4 expresszáló *Abcb1*KO-MDCKII sejtet hoztunk létre. Az ABCB4 expressziót valós idejű kvantitatív PCR-rel (12. ábra), western blottal (13. ábra) ellenőriztük.



12. ábra: ABCB4 mRNS expressziós szintje *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB4 és *Abcb1*KO-MDCKII kontroll sejtekben. Az ABCB4 mRNS szintjét qPCR segítségével mértük. Minden mintában ΔC_T -t kalkuláltunk ($n=3$, átlag \pm SD). Az ABCB4 mRNS expresszió szintjét a referenciagénként használt *Gapdh* szintjéhez normalizáltuk, a következő formula használatával: $2^{(-\Delta CT)} \times 10^6$. ** $P < 0.01$, Welch's t-tesztet végeztünk a szignifikancia vizsgálatára (208).

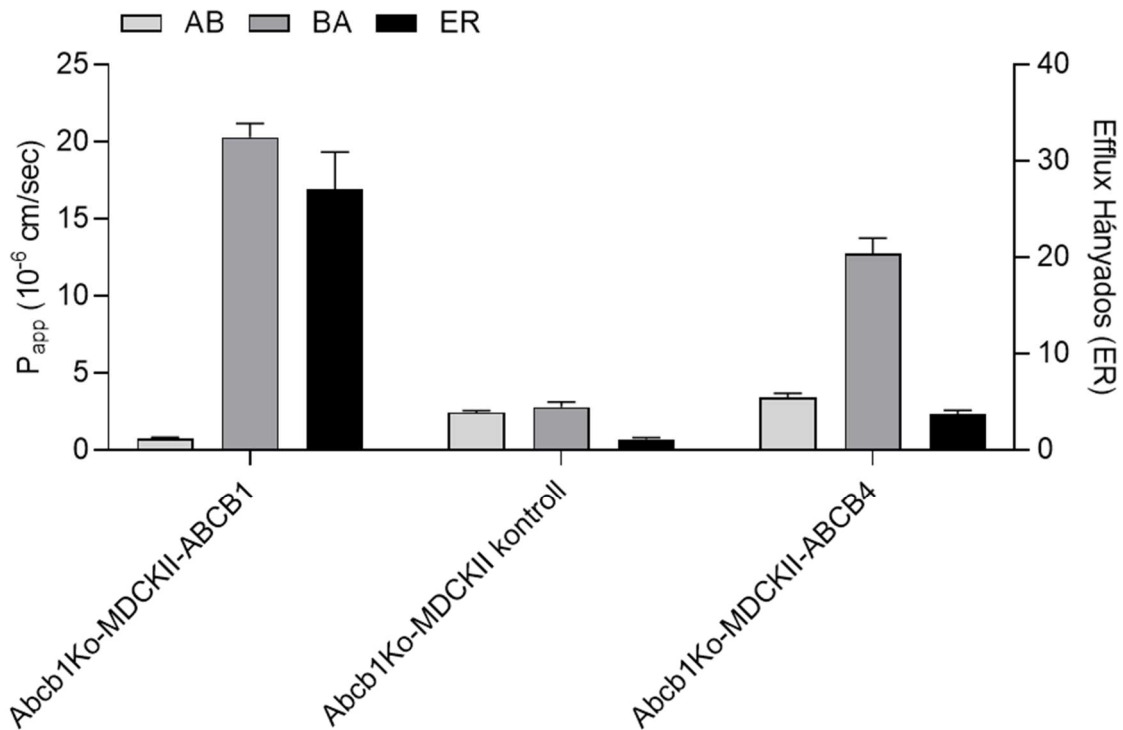


13. ábra: ABCB4 fehérje expresszió Abcb1KO-MDCKII-ABCB4, Abcb1KO-MDCKII-ABCB1 és Abcb1KO-MDCKII kontroll sejtekben Az ABCB4 expresszáló sejtekben ~ 140 kDa ABCB4 fehérjét mutattunk ki western blottal. Antitest-specifikus kontrollként ABCB1-et expresszáló sejtek mintáit is vizsgáltuk. Sem az ABCB1, sem a kontroll sejtekben nem tudtuk detektálni az ABCB4 fehérjét az ABCB4 specifikus primer antitesttel (P3II-26, 1:1000) (208).

Kísérletekkel igazolták, hogy az ABCB4 képes ABCB1 szubsztrátok (digoxin, paklitaxel, vinblasztin, ivermektin) transzportálására, és az ABCB4-mediálta digoxin transzportot ismert ABCB1 inhibitorok, a verapamil és ciklosporin gátolták (159).

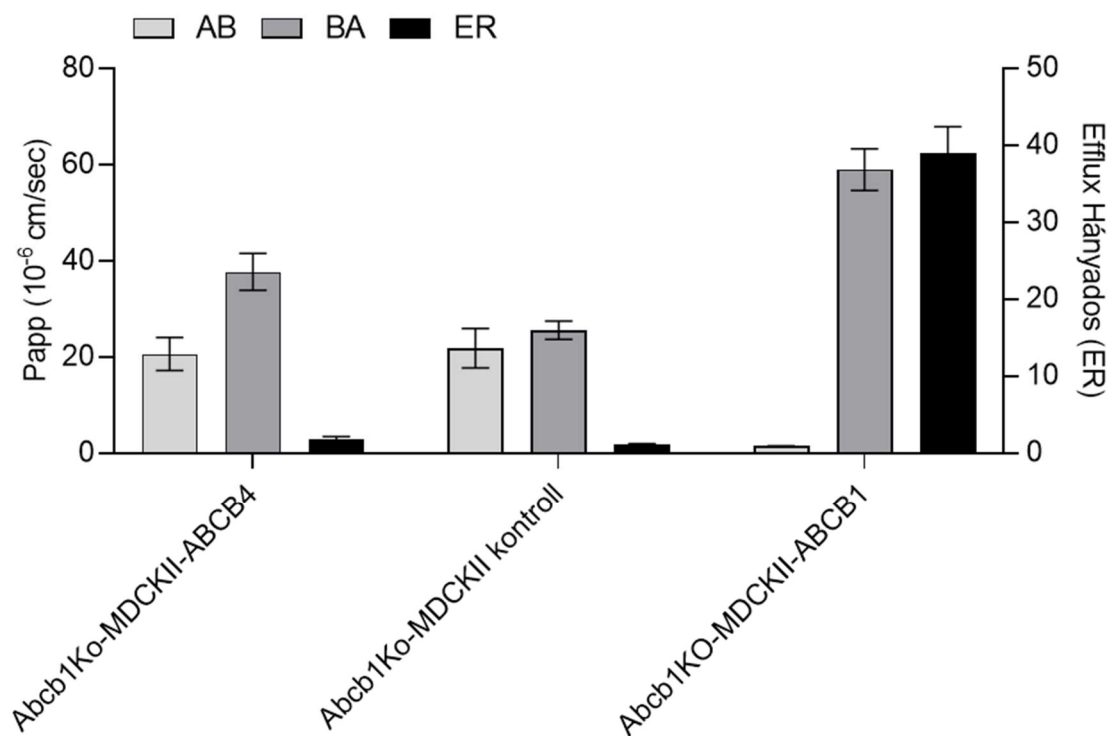
Összehasonlítottuk ismert ABCB1 szubsztrátok, a digoxin, kinidin, prazosin és fexofenadin ABCB1- és ABCB4-mediálta vektoriális transzportját. Az összehasonlításhoz az általunk korábban létrehozott Abcb1KO-MDCKII-MDR1 sejtvonalat használtuk. Kontrollként az üres vektorral transzdukált Abcb1KO-MDCKII sejtvonalt szolgált.

A digoxin ABCB1-mediálta transzportjára harmincas efflux arányt határoztunk meg, a kontroll sejteken mért látszólagos permeabilitás értékek nagyjából azonosak, egy körüli efflux hányadost kaptunk. Az ABCB4-mediálta digoxin transzport efflux aránya (~ 4) elmarad az Abcb1Ko-MDCKII-ABCB1 sejtvonalon mérthez képest (14. ábra), de eredményeink jól korrelálnak az irodalmi adatokkal.



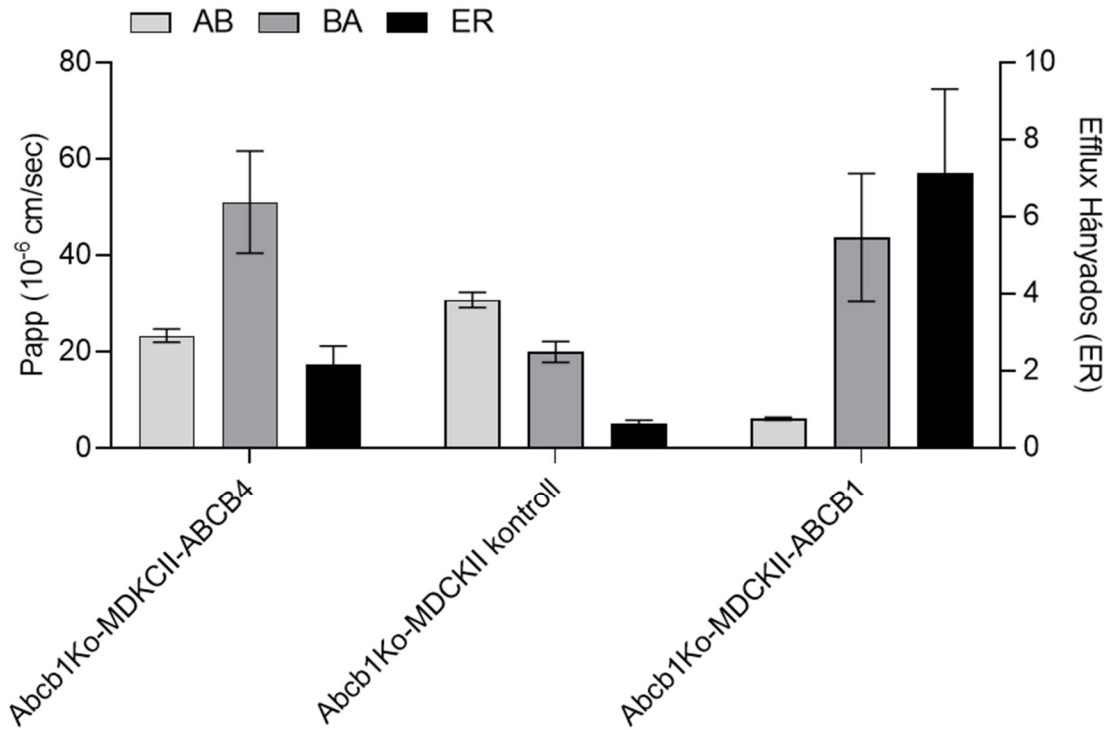
14. ábra: A digoxin ABCB1- és ABCB4-mediálta transzportja Abcb1KO-MDCKII-ABCB1, Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 és kontroll Abcb1KO-MDCKII sejtekben. 1 μ M digoxin 120 perces transzportjához tartozó látszólagos permeabilitás és kalkulált efflux hányados értékek. (n=3, átlag \pm SD).

A kinidin vektorialis transzportja ABCB1-függő volt (ER 39), a kontroll sejteken 1,17 efflux arányt határoztunk meg. A kinidin ebben a rendszerben, ebben az alkalmazott koncentrációban és inkubációs idővel vizsgálva csak gyenge kölcsönhatást mutatott az ABCB4 fehérjével. A kinidin BA irányú látszólagos permeabilitása magasabb volt a kontroll sejteken mérthez képest, az efflux hányados így sem érte el a kettőt (15. ábra).



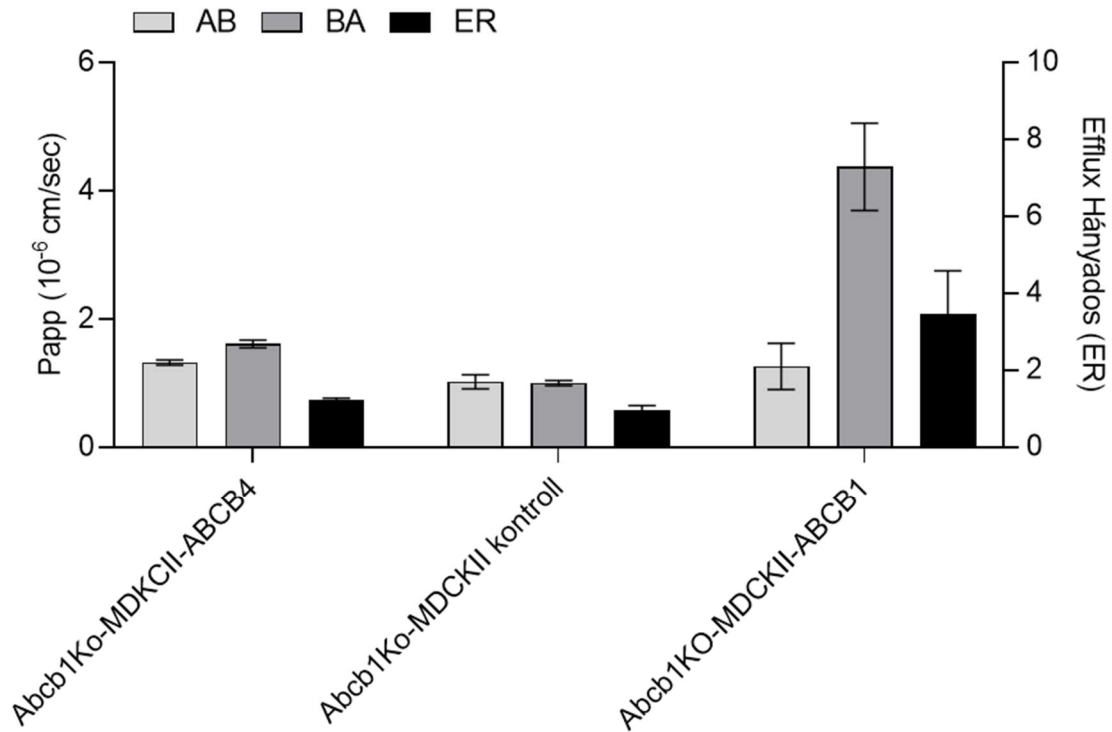
15. ábra: A kinidin ABCB1 és ABCB4-mediálta transzportja Abcb1KO-MDCKII-ABCB1, Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 és kontroll Abcb1KO-MDCKII sejtekben. 1 μ M kinidin 60 perces transzportjához tartozó látszólagos permeabilitás és kalkulált efflux hányados értékek. (n=3, átlag \pm SD).

Kontroll sejteken a prazozin efflux aránya 0,65 volt, az ABCB1-expresszáló sejteken ugyanez az arány 7,13, míg az ABCB4-expresszáló sejteken a prazozin transzportjára 2,18 efflux hányadost kalkuláltunk (16. ábra).



16. ábra: A prazosin ABCB1 és ABCB4-mediálta transzportja Abcb1KO-MDCKII-ABCB1, Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 és kontroll Abcb1KO-MDCKII sejtekben. 1 μ M prazosin 60 perces transzportjához tartozó látszólagos permeabilitás és kalkulált efflux hányados értékek. (n=3, átlag \pm SD).

A fexofenadin efflux hányadosa mind a kontroll, mind az ABCB4-expresszáló sejteken 2 alatt maradt. Ugyanez ABCB1-expresszáló sejteken a 3,47 volt (17. ábra). Azt találtuk, hogy a fexofenadin vektoriális transzportja csak ABCB1 függő, összhangban azzal az irodalomban leírt eredménnyel, miszerint a fexofenadin nem hatott kölcsön májsejt alapú esszében még 300 μ M végkoncentrációban sem az ABCB4 fehérjével (39).



17. ábra: A fexofenadin ABCB1 és ABCB4-mediálta transzportja Abcb1KO-MDCKII-ABCB1, Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 és kontroll Abcb1KO-MDCKII sejtekben. 50 μ M fexofenadin 120 perces transzportjához tartozó látszólagos permeabilitás és kalkulált efflux hányados értékek. (n=3, átlag \pm SD).

A további esszé fejlesztéshez a digoxint (1 μ M, 180 perc inkubáció) választottuk ABCB4-specifikus próbaszubsztrátként.

Mivel az általunk létrehozott rendszerben nem az ABCB4 fiziológias szubsztrátját, a foszfatidilkolint használjuk, hanem a digoxint, mint gyógyszer szubsztrátot, felmerült a kérdés, hogy alkalmas-e az esszé gyógyszerek ABCB4 modulálásán keresztüli DILI potenciáljának vizsgálatára. A kérdés részleges megválaszolására különböző DILI kategóriába sorolt gyógyszerek ABCB4 működésére kifejtett hatását vizsgáltuk meg, majd a kapott eredményeket összevetettük az irodalomban fellelhető eredményekkel. A gyógyszerek DILI besorolását az FDA honlapján elérhető Liver Toxicity Knowledge Base, Drug Induced Liver Injury Rank (DILIRank) Dataset adatbázisából vettük. A gyógyszereket

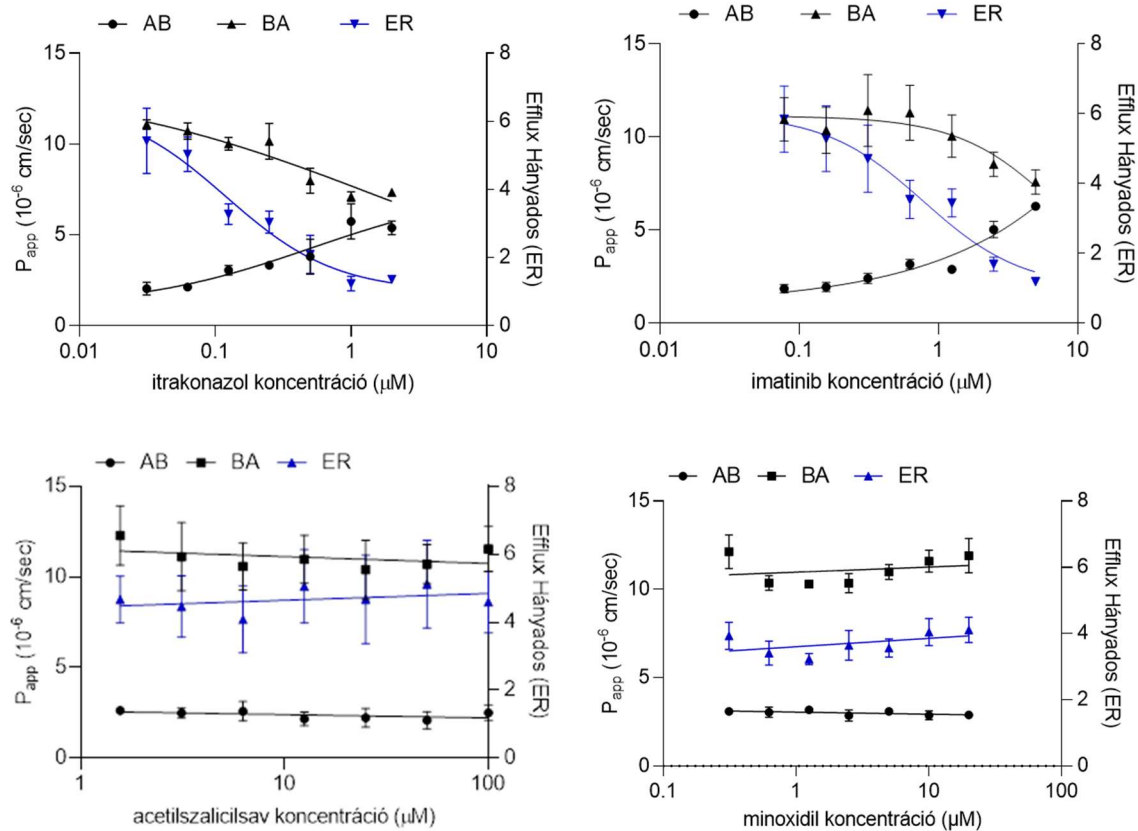
potenciális DILI kauzalitás alapján osztják fel 1.) legjelentősebb, 2.) kevésbé jelentős, 3.) DILI-t nem okozó és 4.) bizonytalan besorolású csoportokba. Eredményeinket a 11. táblázat foglalja össze.

11. táblázat: Gyógyszerek ABCB4 aktivitásra kifejtett hatása. Az IC₅₀ értékeket az efflux hányadosokból nemlineáris regresszióval határoztuk meg (208).

DILI csoport	Gyógyszer	IC ₅₀ (μM)
1	imatinib	1,24
	erlotinib	60% gátlás 5 μM koncentrációban, IC ₅₀ értéket nem határoztunk meg
	szorafenib	4,42
	gefitinib	0,81
	itrakonazol	0,17
	flukonazol	>3
	ketokonazol	0,56
	lopinavir	0,6
	ritonavir	0,73
	darunavir	60% gátlás 10 μM koncentrációban, IC ₅₀ értéket nem határoztunk meg
	acetilszalicilsav	>100
	metotrexát	>10
	benzbromaron	19,89
	karbamazepin	>80
	levofloxacin	>80
klaritromicin	>80	
amiodaron	>10	
2	szakvinavir	1,4
	fenofibrát	>20

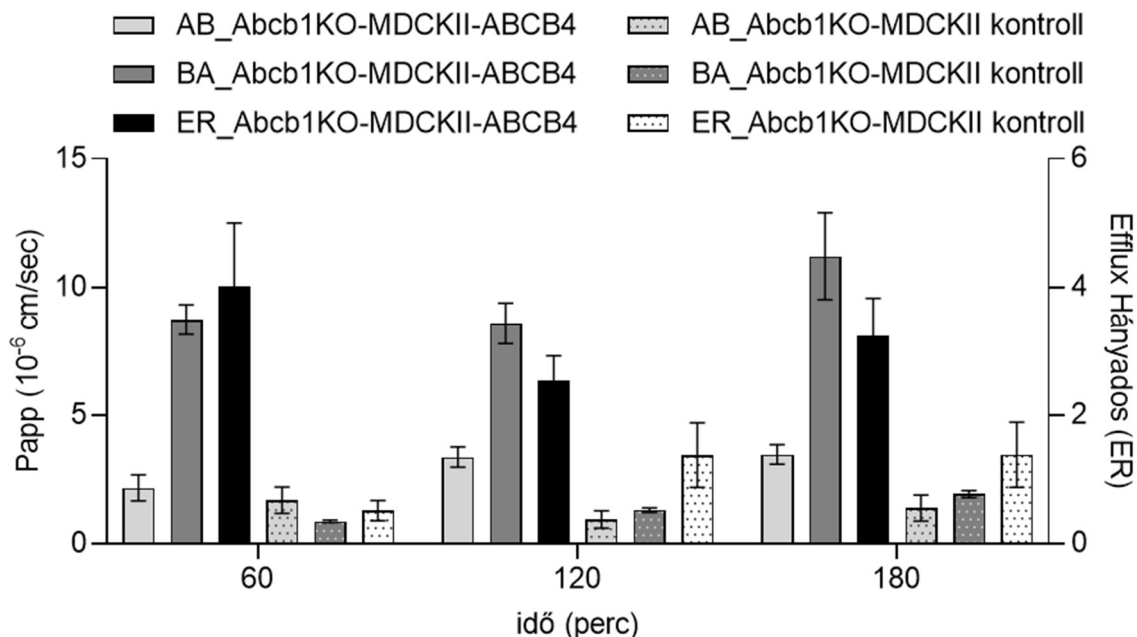
	ivermektin	0,53
	amlodipin	17,86
	pantoprazol	>10
	verapamil	0,39
3	minoxidil	>20
	furoszemid	>80
egyéb	azunaprevir	50% gátlás 3 μ M-nál
	idelalizib	>5
	ciclosporin A	0,46
	valsopodar	<0,15
	prazozin	16,12
	carvedilol	0,70
	zosuquidar	<0,07
	mibefradil	0,40
	diltiazem	48,61
	elakridar	<0,156
	kinidin	1,09
	felodipin	>30

Reprezentatív példaként az ABCB4 fehérjével kölcsönható és nem kölcsönható gyógyszerek a 18. ábrán kerülnek bemutatásra.



18. ábra: Az itraconazol, imatinib, acetilszalicilsav és minoxidil hatása az ABCB4-mediált digoxin transzportra. Az 1 μM digoxin 180 perces transzportjához tartozó látszólagos permeabilitás és kalkulált efflux hányados értékek a különböző gyógyszerek növekvő koncentrációjának függvényében. Felső paneleken az ABCB4 gátlószerek itraconazol és imatinib, alsó paneleken a digoxin transzportját nem befolyásoló acetilszalicilsav és minoxidil ($n=3$, átlag \pm SD) (208).

A tirozin-kináz gátló gyógyszerek potens ABCB4 gátlószerek bizonyultak. Megvizsgáltuk, hogy az ABCB4 fehérje képes-e ezek transzportjára is. Azt találtuk, hogy a gefitinib (0,5 μM) vektoriális transzportját mediálja az ABCB4 (19. ábra).



19. ábra: ABCB4-mediálta gefitinib transzport Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 sejtekben.

A gefitinib transzportját az ABCB4 mediálta, a különböző időpontokban meghatározott látszólagos permeabilitás és efflux hányados értékek alapján. A kontroll sejtekben nem detektáltunk aktív transzportot ($n=3$, átlag \pm SD) (208).

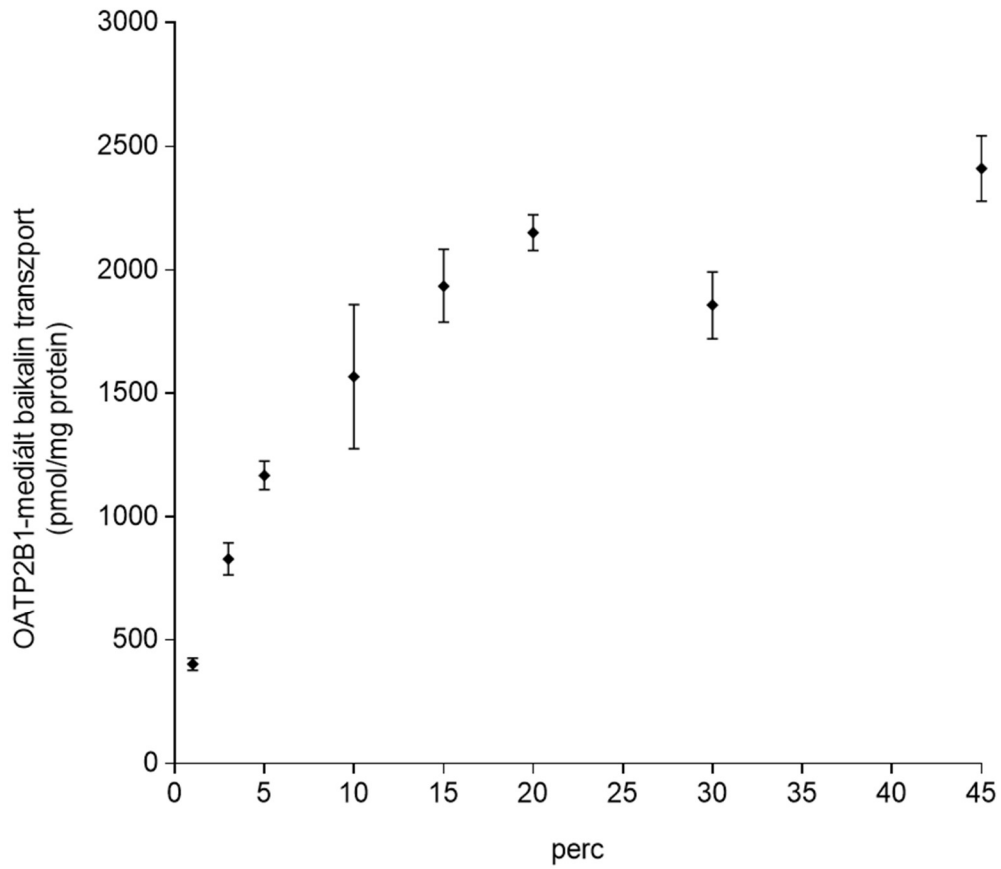
Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az általunk létrehozott Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 sejtes esszé alkalmas gyógyszerek kölcsönhatás vizsgálatára a sejtípus korlátainak figyelembevételével.

A kölcsönható gyógyszerekre meghatározott IC_{50} értékek alacsonyabbak, mint a májsejt alapú rendszerekben kapott értékek. Ez a különbség fakadhat abból, hogy a vizsgálati rendszerünk kevésbé komplex a hepatocitákkal összehasonlítva, az ABCB4 expresszió különbségéből, illetve abból, hogy nem az ABCB4 fiziológias szubsztrátjának transzportját vizsgáltuk, hanem a digoxinét. Ezért távlati terveink közt szerepel, hogy megvizsgáljuk annak a lehetőségét, hogy az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 vektoriális transzport esszében foszfátidil-kolint használjunk szubsztrátként.

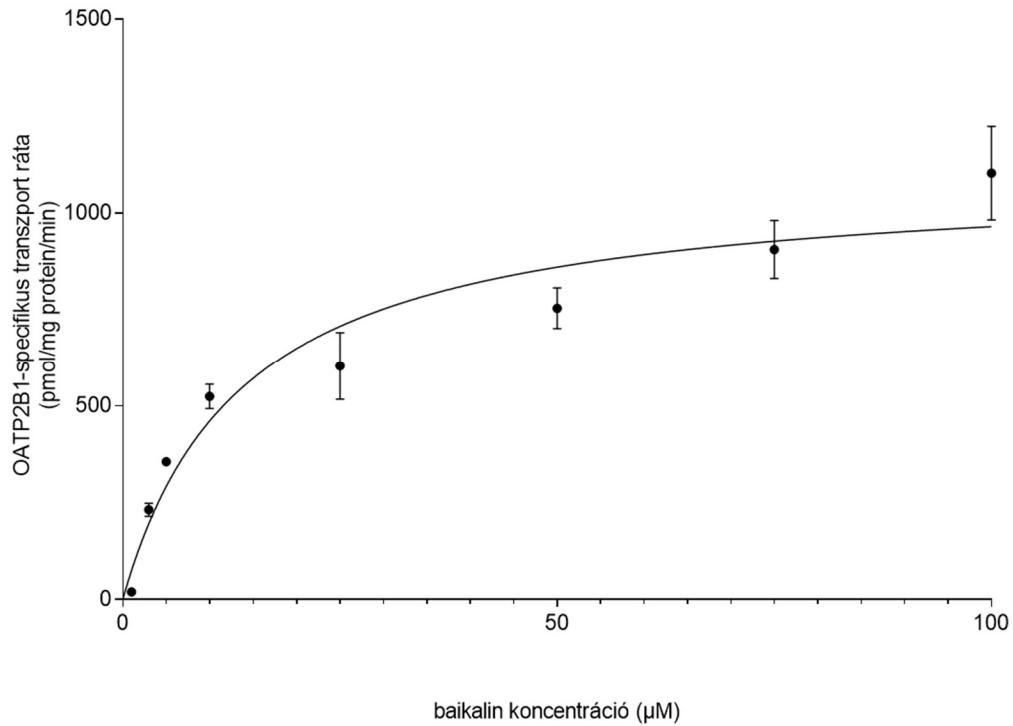
5.4. A baikalin potenciális transzporter, növényi hatóanyag-gyógyszer interakciók vizsgálatainak eredményei

Ismert volt, hogy a baikalin az OATP1B3 és OATP2B1 transzporterek működését képes gátolni (209, 210). Kalapos-Kovács Bernadett és munkatársai korábban egy vizsgálatban azonosították a baikalin enterohepatikus transzportjában szerepet játszó efflux transzportereket (186). Az OATP2B1 kooperálhat ABCC3, ABCC4, ABCG2 és ABCC2 efflux és OATP1B3 uptake transzporterekkel. A fenti ismeretek alapján megvizsgáltuk, hogy a baikalin szubsztrátja-e az OATP2B1 és OATP1B3 fehérjéknek, ehhez az OATP1B3- és OATP2B1 overexpresszáló és kontroll sejteket a kísérlet előtt 24-lyukú lemezre ültettük 400000 sejt/ lyuk denzitásban. Megbecsültük a baikalin transzport kinetikai paramétereit, idő- és koncentrációfüggés kísérletekben. OATP2B1 transzport kísérletekben 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 és 45 percig inkubáltunk a baikalinnal. A transzport 5 percig volt lineáris, így a koncentrációfüggést 3 perces inkubációs idővel végeztük, a baikalint 1-100 μM végső koncentrációban alkalmaztuk. A baikalin OATP1B3-mediálta transzportját 60 percig mértük, 8 időpontban. A baikalin koncentrációfüggő transzportját e transzporter esetén 45 percig mértük, az akkumulációt a 21,09 - 2700 μM tartományban vizsgáltuk.

Az OATP2B1-mediálta baikalin transzport kinetikája 5 percig lineáris (20. ábra), így a koncentrációfüggő transzport kísérletet 3 perc inkubációs idővel végeztük. A transzport telíthető volt, a kalkulált OATP2B1-specifikus K_M érték $9,71 \pm 3,56 \mu\text{M}$ (21. ábra).

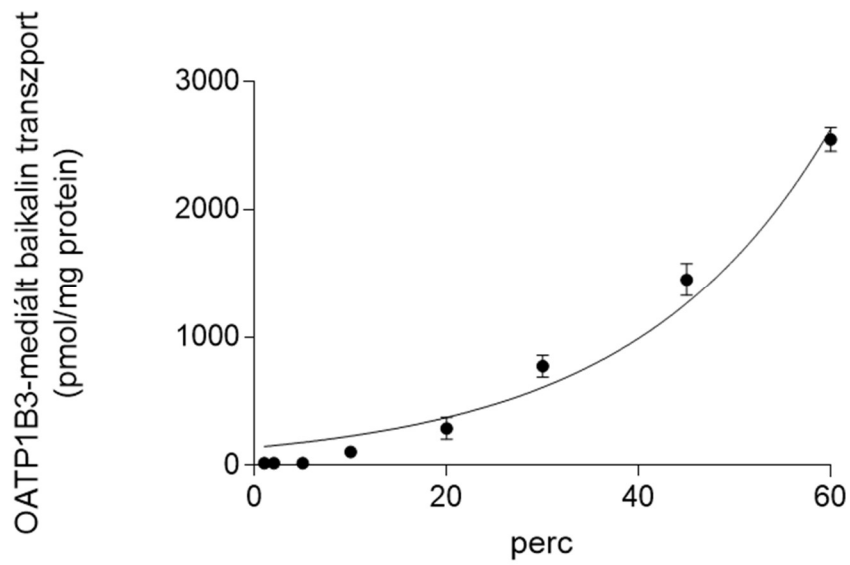


20. ábra: A baicalin OATP2B1-specifikus transzportjának időfüggése. 5 μ M baicalin OATP2B1-specifikus akkumulációját vizsgáltuk több időpontban. A transzport kinetikája 5 percig lineáris. (n=3, átlag \pm SD) (211).

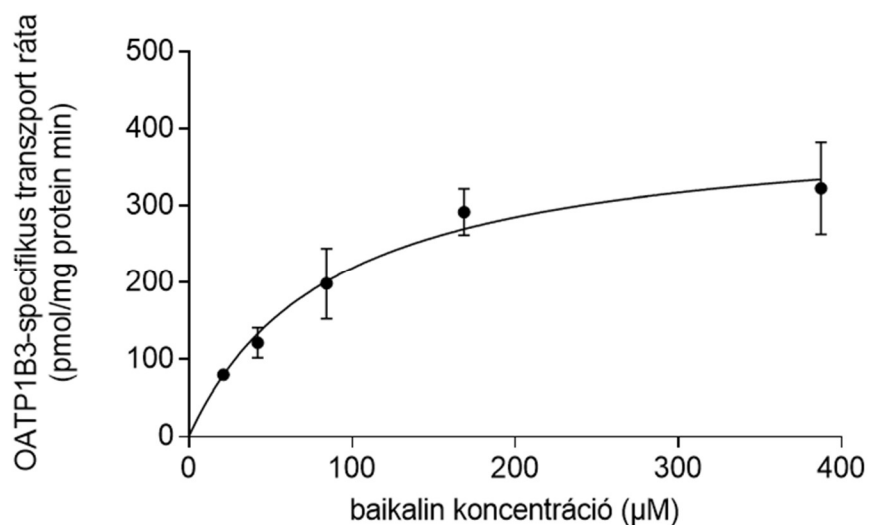


21. ábra: A baicalin OATP2B1-specifikus transzportjának koncentrációfüggése. A baicalin OATP2B1-specifikus akkumulációját vizsgáltuk több végkoncentrációnál, 3 percig inkubálva, a transzport telítési kinetikát követett. A specifikus transzport rátából meghatároztuk a Michaelis-Menten állandót, ($n=3$, átlag \pm SD) (211).

A baicalin OATP1B3 kölcsönhatást alacsonyabb transzport kapacitás jellemezte, mint az OATP2B1 kölcsönhatást. A baicalin az OATP1B3-expresszázó sejtekbe is időfüggően akkumulálódott, s a vizsgált tartományban, 60 percig exponenciális kinetika volt jellemző (22. ábra). Az OATP1B3-mediálta transzport is telítést mutatott, a számolt K_M érték $59,62 \pm 9,60 \mu\text{M}$ (23. ábra).



22. ábra: A baicalin OATP1B3-specifikus transzportjának időfüggése. 10 μ M baicalin OATP1B3-specifikus akkumulációját vizsgáltuk több időpontban (n=3, átlag \pm SD). (211)



23. ábra: A baicalin OATP1B3-specifikus transzportjának koncentrációfüggése. A baicalin OATP1B3-specifikus akkumulációját vizsgáltuk több végkoncentrációnál, 45 percig inkubálva, a transzport telítési kinetikát követett. A specifikus transzport rátából meghatároztuk a Michaelis-Menten állandót, ($n=3$, átlag \pm SD) (211).

6. Megbeszélés

Munkánk során tanulmányoztuk a transzporter vizsgálatok széleskörű szerepét, gyakorlati alkalmazásának lehetőségét.

6.1. MtTopo-I inhibitorok transzporter kölcsönhatásai

Humán transzporter kölcsönhatás vizsgálatokat végeztünk a korai gyógyszerfejlesztés fázisában járó olyan vegyületekkel, melyeket a világszerte egyik legmagasabb halálozással járó fertőző betegség, a tuberkulózis (212) kezelésére fejlesztenek.

A gyógyszerrezisztens TBC esetek számának emelkedése új terápiás lehetőségek fejlesztését sürgeti. Az intrinszik rezisztencia mechanizmusok mellett az extrinszik rezisztencia kialakításában az episztázis, klonális interferencia, a sejthártya impermeabilitása, a mikobakteriális efflux pumpák működése (213), mint bakteriális mechanizmusok vesznek részt.

A bakteriális rezisztencia mechanizmusok mellett a széles szubsztrátspecificitású humán ABC transzporterek vehetnek részt a gyógyszerrezisztencia kialakulásában (214). A gyógyszerkölcsönhatásokban főszerepet játszó két fő efflux pumpa, az ABCB1 és az ABCG2 működésükkel gyógyszerrezisztenciát is okozhatnak (29). Számos tuberkulózis kezelésére is alkalmas gyógyszer az ABCB1 és ABCG2 fehérjék szubsztrátjai, inhibitorai vagy épp indukálószerai (215-217). A tuberkulózis kezelése elhúzódó gyógyszeres kezelést kíván, így a humán transzporterek szerepének vizsgálata különösen fontos (218-220) és hasznos már az antituberkulotikum fejlesztés korai fázisában.

A mikobakteriális MtTopo-I DNS repair enzim ígéretes célpont antituberkulotikumok fejlesztésére (221). A Vichem Chemie Kutató Kft. vegyülettárából hét benzo(g)-kinoxalin, kinoxalin vagy styryl-benzo(g)-kinazolin alapvázal rendelkező molekulát választottunk szélesebbkörű vizsgálatra.

A célzott antituberkulotikum fejlesztés során a molekulák szűrésére a fentiek figyelembevételével számos biológiai esszét ötvöztünk. Egy fehérjedokkoló algoritmus

segítségével *in silico* azt kapták, hogy a 7 vizsgált vegyület képes nagy affinitással kötődni a MtTopo-I enzim vizsgált struktúrájához, sőt két molekula a referenciavegyület, a klomipraminhoz képest még kedvezőbb kötődési tulajdonságokkal bír.

A vegyületek MtTopo-I enzimgátló hatását meghatározták *E. coli*-ban termeltetett, majd tisztított enzimen *in vitro* DNS relaxációs esszéiben. A kiválasztott vegyületek mindegyike gátolta az MtTopo-I enzimet valamilyen mértékben, és a legpotensebb inhibitornak a VCC450327 molekulát találták.

A virulens H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* törzs szaporodására gyakorolt gátlóhatásukat először a vegyületek 20 μ M-os koncentrációjánál vizsgálták. Három vegyület a szerkezeti hasonlóság és a mért enzimgátlás ellenére nem gátolta a H37Rv törzs baktériumainak szaporodását, míg négy gátló vegyület esetén a meghatározott MIC₉₀ értékek alapján rangsorolva a VCC478498 > VCC340963 > VCC450822 > VCC891909 sorrend alakult ki *in vitro* antimikrobiális hatásuk alapján.

A különböző gyógyszermolekula-jelöltek humán ABC transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére az egyik legismertebb módszert, a transzporter ATPáz aktivitásának mérését alkalmaztuk. Azt találtuk, hogy a VCC389777 molekula szignifikánsan stimulálta az ABCG2 ATPáz aktivitását, ebből arra következtethettünk, hogy a VCC389777 molekula transzportált szubsztrát. További három anyag az ABCB1 ATPáz aktivitását stimulálta, így ezek is transzportált szubsztrátok lehetnek (VCC389777, VCC979812, és VCC450822). A VCC450822 vegyület a lassan transzportált szubsztrátokra vagy inhibitorokra jellemző módon hatott kölcsön az ABCB1 fehérjével (201). Alacsonyabb alkalmazott koncentrációban stimulálta az ABCB1 ATPáz aktivitását, míg magasabb koncentrációban gátolta azt. A vegyületek ABCG2 és ABCB1 fehérje kölcsönhatását tovább vizsgáltuk sejtes esszéikben is. Azt találtuk, hogy a VCC891909 vegyület kivételével az összes molekula gátolta a sejtekből az ABC transzporter-mediálta specifikus fluoreszcens szubsztrát kipumpálását. A VCC450327 molekula nem hatott kölcsön az ABCB1 fehérjével ebben az esszéiben, s az ABCG2 kölcsönhatás is csak mérsékelt volt. A vegyületek humán sejtekre kifejtett toxikus hatását két nem tumoros, a humán elsődleges fitymafibróblaszt (HFF) és a humán embrionális vese (HEK293) sejtvonalakon, illetve az A431 humán epidermoid karcinóma sejtvonalon is megvizsgáltuk. Az ABCB1 és ABCG2 fehérjék

működésükkel befolyásolhatják a vegyületek toxikus hatását, így ABCB1-A431 és ABCG2-A431 sejtvonalakon is elvégeztük a toxicitás vizsgálatokat. A VCC389777 és VCC450327 egyik alkalmazott sejtvonalra sem fejtettek ki toxikus hatást a 72 órás inkubáció alatt. A VCC979812 vegyület által kifejtett toxikus hatás IC_{50} értéke a legmagasabb alkalmazott koncentrációnak, 20 μM -nak felelt meg HFF és A431 szülői sejtvonalon, HEK293 sejttípusokon nem fejtett ki toxikus hatást. Az ABCB1-A431 és ABCG2-A431 sejteken a transzporterek nem befolyásolták a VCC979812 toxicitását a szülői sejten mérthez képest. A VCC480522, VCC340963 és VCC478498 vegyületek toxikusak voltak a HFF, HEK293 és A431 szülői sejtvonalra is. A szülői A431 sejtvonalra kifejtett toxikus hatásuk az ABCB1 és ABCG2 fehérjéket expresszáló sejteken is megfigyelhető volt, annak ellenére, hogy ezek a vegyületek kísérleteinkben kölcsönhatást mutattak a két vizsgált ABC transzporter fehérjével.

A VCC891909 vegyület, ami a MtTopo-I enzim működését gátolta 7,5-10 μM -os tartományban, és *in vitro* baktericid hatásának MIC_{90} értéke 10,4 μM volt, egyik humán sejtvonalra sem fejtett ki toxikus hatást, s korábban megállapítottuk, hogy a vizsgált ABC transzporterekkel sem hatott kölcsön.

Eredményeink összegezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a humán sejtekre toxikus, de antimikrobiális hatást kifejtő VCC450822, VCC340963 és VCC478498 vegyületek valószínűleg nem alkalmasak a további gyógyszerfejlesztésre. A VCC979812, a VCC389777 és a VCC450327 vegyületek nem fejtettek ki antimikrobiális hatást a legmagasabb, 20 μM -os koncentrációban a virulens H37Rv *Mycobacterium* törzsre, így ezek sem tekinthetők alkalmas jelöltnek a továbbiakban.

A VCC891909 vegyület kedvező tulajdonságokkal bír, s potenciális gyógyszerjelölt lehet, mert hatékonyan gátolta az MtTopo-I enzimet, antimikrobiális hatást mutatott, anélkül, hogy kölcsönhatna a vizsgált humán ABC transzporterekkel, s toxikus hatást fejtett volna ki az alkalmazott sejtvonalakra.

A célzott támadáspontú antituberkulotikum-fejlesztés elősegítésére a specifikus antimikrobiális hatás vizsgálata mellé következő *in vitro* szűrőlépcsőket illesztettünk be, amelyek a humán ABC transzporterek farmakokinetikai hatásának predikciójával

hozzájárulnak az ígéretes molekula kiválasztásához (202). Ez a példa más gyógyszer típusok fejlesztése során is hasznos lehet.

6.2. COVID-19 kezelésre használt gyógyszerek transzporter kölcsönhatásai

A jelenleg forgalomban lévő gyógyszerek közül számos szert alkalmaztak a SARS-CoV-2 okozta megbetegedés kezelésére. Az általunk végzett munka időpontja a COVID-19 járvány korai időszakában zajlott, amikor az antivirális szerek *in vitro* eredmények és a klinikai kipróbálás stádiumában voltak, azóta több esetben határozottan elvetették azokat a terápiákat, amelyeket az általunk is vizsgált gyógyszerekkel próbáltak, illetve új, hatékonyabb gyógyszerhatóanyagokat fejlesztettek. S bár a hatóságok a forgalomba hozatal után minden gyógyszert gondosan figyelemmel kísérnek, a COVID-19 terápia megválasztásakor a komedikáció hatásait - a gyors adaptáció miatt - nem ismerhettük részletesen. Ezért már forgalomban lévő vagy újonnan törzskönyvezett, a COVID-19 betegség terápiájában használt szerek kölcsönhatásait vizsgáltuk meg humán SLC és ABC transzporterekkel (222). Munkánk során elsősorban az intesztinális és hepatikus barrierben és a vér-agy gátban kifejeződő transzporterek gyógyszerkölcsönhatásban betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk számos *in vitro* esszé alkalmazásával.

Eredményeink azt mutatták, hogy Japánban, az influenza speciális eseteire elfogadott valamint ebola kezelésében klinikai vizsgálatokban szereplő purinanalóg antivirális szer, a favipiravir (223) nem hatott kölcsön egyik általunk vizsgált transzporter fehérjével sem. A májban főleg aldehyd-oxidázok és xantin-oxidázok segítik a metabolizmusát (224), s bár ezidáig nagyon kevés információ áll rendelkezésre aldehyd-oxidáz-mediálta klinikailag releváns gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokról, ennek potenciális rizikója fennáll (225).

A klorokint és hidroxiklorokint első vonalbeli terápiais és profilaktikus szerként használják többek közt malária és autoimmun kórképek kezelésére (226). A két szer farmakokinetikai tulajdonságai hasonlóak, toxikus dózisaik és terápiais indikációjuk azonban eltérő. Az EMA és FDA nem fogadták el őket a COVID-19 terápiais alkalmazására, mert klinikai vizsgálatokban nem bizonyultak hatásosnak, viszont kardiológiai mellékhatásokat okoznak

(227, 228). Gyors gasztrointesztinális abszorpció és vesén keresztüli ürülés jellemzi őket, sem az ABCB1, sem az ABCG2, sem az ABCC1 fehérjékkel nem hatottak kölcsön. Gátolták viszont az OATP1A2 és OATP2B1 transzportereket. Az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék kifejeződnek a vér-agy gáton (229) és a vékonybélhamban (230, 231), emellett az OATP1A2 a proximális tubulus sejteinek apikális membránjában (232) és a retina pigment epitéliumban (233), az OATP2B1 pedig a hepatocitákban is expresszálódik (234). Az OATP1A2 az all-transz-retinol felvételét mediálja (233). Ismert, hogy a klorokin/hidroxiklorokin retinopátiát okoz, ennek molekuláris mechnizmusa még nem teljesen tisztázott (235). OATP1A2 kölcsönhatás eredményeink másokéval összhangban állnak (236), s megerősíthetik azt a feltételezést, miszerint a hosszútávú klorokin/hidroxiklorokin kezelés okozta retinopátia kialakulásának oka részben az OATP1A2-mediálta all-transz-retinol felvétel gátlása (237). A klorokin/hidroxiklorokin az OATP2B1 fehérje működését is gátolta, így ezen szerek alkalmazása más gyógyszerekkel kombinálva potenciálisan befolyásolhatja a terápiás kimenetelt, mint ahogy azt az OATP1A2 (238) és OATP2B1 szubsztrát (239) metotrexát egyidejű alkalmazásakor is látjuk.

Az antiparazita hatású ivermektin felszívódását befolyásolja az ABCB1 aktivitása (240). A vér-agy gáton kifejeződő ABCB1 mellett az ABCG2 fehérjének is kiemelt szerepe lehet a potenciálisan neurotoxikus ivermektin elleni védelemben. Az ivermektin neurotoxikus hatást fejt ki *Abcb1* knock-out egerekben, a természetes *Mdr1*-deficiens genotípusú *Collie* pásztorkutyákban és olyan emberekben, akikben az ABCB1 expressziója alacsonyabb (241, 242). Vizsgálatainkban az ivermektin potensen gátolta az ABCB1 fehérjét. Eredményeink összhangban vannak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek az ivermektin és számos multispecifikus transzporter kölcsönhatásáról számoltak be (243, 244). Az ivermektin amellett, hogy gátolta az ABCB1 transzporter működését, erősen gátolta az ABCC1 és ABCG2 fehérjék működését is.

Az *in vitro* kísérleti eredmények kvalitatív vagy kvantitatív átültetését az *in vivo* hatások előrejelzésére *in vitro*-*in vivo* extrapolációval végeztük el. Ehhez 165 µg/kg ivermektin dózissal kalkulálva a plazmában elért maximális ivermektin koncentráció és *in vitro* kalkulált ABCB1 és ABCG2 esszékből kapott IC₅₀ értékek hányadosát használtuk.

A hepatikus és renális ABCB1 efflux kölcsönhatásra számolt 0,17 hányados meghaladta az FDA által megállapított alsó küszöbértéket (teljes steady-state maximális plazmakoncentráció/ $IC_{50} \geq 0,1$). Az intesztinális ABCB1 efflux kölcsönhatásra egyszeri 15 mg dózissal számolva ez a hányados (0,6 μM IC_{50} esetén 114, 0,3 μM IC_{50} értékkel kalkulálva 228) többszörösen meghaladja az FDA által megállapított alsó küszöbértéket ($[I]_2/IC_{50} \geq 10$), így -mindkét módszerrel számolva- fennáll a klinikailag jelentős kölcsönhatás esélye olyan gyógyszerekkel, amelyek az ABCB1 szubsztrátjai vagy inhibitorai. Emellett hangsúlyozandó, hogy fertőzésekben a felszabaduló proinflammatorikus citokinek kölcsönhatnak a multispecifikus ADME transzporterekkel, befolyásolva azok működését. Ismert, hogy gyulladással kísért kórképekben az intesztinális ABCB1 expressziója csökkent (245), így az ivermektin kölcsönhatás ABCB1 szubsztrát vagy inhibitor gyógyszerekkel még súlyosabb mellékhatások kialakulását okozhatja.

Az ABCB1 és ABCB4 fehérjék nagyfokú homológiát mutatnak, így nem volt meglepő, hogy az ivermektin már 0,78 μM koncentrációban is teljesen gátolta az ABCB4-mediált digoxin transzportot. Az ivermektin enyhe glutamát-piruvát-transzamináz plazmaszint emelkedést okozhat, klinikailag nem jelentős májkárosodással, így az ABCB4 gátlás *in vivo* relevanciája kérdéses.

A hepatikus és renális ABCG2 fehérjére vonatkozóan teljes steady-state maximális plazmakoncentráció/ IC_{50} hányadosa 0,047 volt, nem érte el az alsó küszöbértéket. Az intesztinális BCRP kölcsönhatásra számolt $[I]_2/IC_{50}$ hányados kétszerese, illetve hatszorosa a tízes küszöbértéknek, így fennáll a klinikailag jelentős kölcsönhatás esélye olyan gyógyszerekkel, amelyek az ABCG2 szubsztrátjai vagy inhibitorai.

Azt találtuk, hogy az ABCC2 és ABCC3 efflux pumpák is befolyásolhatják az ivermektin fiziológiás barriereken keresztüli fluxusát, s az ivermektin kölcsönhat a májsejtek kanalikuláris membránjában kifejeződő epesó transzporterrel, az ABCB11 fehérjével is.

SLC transzporterek és ivermektin kapcsolatát vizsgálva, az elsősorban májban és vesében expresszálódó MATE1 és OCT1, valamint a kizárólag májban található NTCP transzporterekkel nem találtunk kölcsönhatást.

Az ivermektin gátolta az általunk vizsgált OATP fehérjék működését. Az irodalomban elsőként leírtuk az OATP1A2 és ivermektin kölcsönhatását. Az OATP1A2 és az OATP2B1

fehérjék gátlása az intesztinális, hepatikus lokalizáció és vér-agy gáti expresszió miatt a szubsztrátgyógyszerek plazma és szöveti koncentrációjában ellentétes hatást okozhat, a szisztémás és lokális hatás nehezen elkülöníthető. A rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet megjósolni, hogy a GABA_A receptorokat aktiváló ivermektin (246) neurotoxikus hatásának kialakulásához hozzájárul-e - és ha igen, milyen módon - a DHEAS, mint a GABA_A receptor negatív allosztérikus modulátorának (247) központi idegrendszeri transzport egyensúlyának eltolódása. Kísérleteinkben az ivermektin kölcsönhatott mind a DHEAS (248) felvételét végző OATP-vel (54), mind az ABCG2 fehérjével (249).

Az ivermektin potensen gátolta a piranin OATP1B3-mediálta felvételét. Az in vitro eredmények in vivo kiterjesztésére az OATP1B3 kísérletes adatokból R-értéket számoltunk, mely megközelítette (1,07) alsó küszöbértéket (1,1).

Multispecifikus efflux pumpákkal, SLC transzporterekkel való kölcsönhatása és nagyobb molekulatömege miatt olyan molekulának tekintjük az ivermektint, mely klinikailag releváns gyógyszerkölcsönhatást okoz.

A HIV-proteáz inhibitor ritonavir és lopinavir a SARS-CoV-2 3CL-pro proteáz gátlásán keresztül gátolják a vírus replikációját (250).

Hatásuk kifejtéséhez azonban magas in vivo koncentrációt kell elérniük (251). 400 mg lopinavir/100 mg ritonavir kombinációban alkalmazva a lopinavir a plazmában 11-20 µM maximális koncentrációt ér el, míg a ritonavir 1-1,73 µM-t (252). Transzporter kölcsönhatás vizsgálataink eredményei összhangban állnak az irodalmi adatokkal (253-256).

A ritonavir és lopinavir külön-külön potensen gátolták az ABCB1 és ABCG2 transzportereket. A maximális plazmakoncentrációk és in vitro IC₅₀ értékek hányadosa, és a kalkulált maximális vékonybélbeli koncentráció és in vitro IC₅₀ értékek hányadosa ABCB1 és ABCG2 kölcsönhatások esetén in vivo kiterjesztve messze meghaladták az alsó küszöbértéket, ezért az ABCB1 és ABCG2 transzporterek gátlása releváns tényező gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás kialakulásában (257, 258).

Mindkét gyógyszer potensen gátolta az OATP1A2 és OATP2B1 transzportereket. E kölcsönhatások a szakirodalomból már ismertek (259-261).

A DDI rizikó becslés során az OATP1B1 kölcsönhatásra kalkulált R érték 2,39, az OATP1B3 kölcsönhatásra 1,74, így in vivo befolyásolhatják más egyidejűleg alkalmazott gyógyszerek

farmakokinetikáját (262, 263). A ritonavir két, potenciálisan májkárosító gyógyszerek hatásait összegző adatbázis szerint potenciális DILI kauzalitás alapján a legjelentősebb DILI-t okozó csoportba tartozik. Klinikai adatok alapján a ritonavir/lopinavir terápiában részesülő COVID-19 betegcsoportokban magasabb a gyógyszer okozta májkárosodás aránya (264, 265). A ritonavir számos, még nem teljesen leírt folyamat által okoz májkárosodást. Ismert, hogy a lopinavir/ritonavir a CYP3A enzimek erős gátlószerei, a ritonavir a CYP1A2-t indukálja, míg CYP3A4 és CYP2D6 enzimeket gátolja (265, 266). Így számos CYP enzimeken metabolizálódó gyógyszerrel együtt alkalmazva toxikus hatást váltanak ki (267). A gyógyszer okozta kolesztatikus típusú májkárosodás patológiás mechanizmusai többek közt az epesav transzport gátlása, a mitokondriumok károsodása, hiperszenzitivitási reakció és az epeutak gyulladása (268). A lopinavir és ritonavir gátolták (IC_{50} 7,8 μ M és 3,2 μ M) az epesav-függő kanalikuláris epeszekréciót nagyban meghatározó ABCB11 fehérjét. Bár in vitro kevésbé potens gátlószereknek bizonyulnak, ha in vivo a lokális gyógyszer expozíció kellően magas, az ABCB11 epesav efflux aktivitása csökkenhet. Az ABCB11-mediálta epesav transzport és az ABCB4-mediálta foszfolipid szekréció egyidejű gátlása a gyógyszer okozta kolesztázis rizikófaktora (39). Mind a ritonavir, mind a lopinavir alacsony IC_{50} értékekkel gátolták a kanalikuláris foszfatidilkolin floppáz ABCB4 működését. Fiziológiai körülmények közt a bazolaterális ABCC3 és ABCC4 fehérjék szerepe az epesav efflux folyamatokban elhanyagolható, de kolesztázisban expressziójuk fokozódik (269, 270), s bazolaterális efflux működésükkel védik a hepatocitákat a toxikus epesav akkumulációtól (268). A ritonavir és lopinavir csak olyan magas koncentrációban gátolták ezt a két fehérjét, ami in vivo valószínűleg nem elérhető.

Mindkét gyógyszer gátolta a bazolaterális NTCP transzportert, mely a portális keringésből a hepatocitákba veszi fel az epesókat. Az NTCP gátlása a szérumban emelkedett epesó szintet eredményez, az OATP fehérjék kompenzálják csökkent működését (271).

A hepatociták bazolaterális OCT1 és apikális MATE1 fehérjéi kationos gyógyszerek hepatikus klírenszeiben működnek közre (272). A ritonavir és lopinavir potensen gátolta mindkét fehérjét, szimultán gátlásuk befolyásolhatja többek közt a metformin farmakokinetikáját (273).

A remdezivirt eredetileg ebola vírusfertőzés kezelésére fejlesztették (274), de több országban feltételes, majd teljes érvényű forgalombahozatali engedéllyel hozzáférhetővé tették a SARS-CoV-2 fertőzés kezelésére. A szulfobutil-béta-ciklodextrin (SBE- β -CD)-remdezivir komplexet intravénásan alkalmazzák.

Kísérleteinkkor még kevés adat állt rendelkezésre a remdezivir in vitro transzporter- és enzim-kölcsönhatásairól. Leírták, hogy a CYP2C8, CYP2D6, és CYP3A4 enzimek, az OATP1B1 és ABCB1 szubsztrátja, a CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3, BSEP, MRP4 és NTCP gyenge gátlószere (<https://www.fda.gov/media/137566/download>).

Azt találtuk, hogy a remdezivir az ABCB1 és ABCG2 fehérjék gyenge gátlószere. A remdezivir aktiválta az ABCB1 ATP-áz aktivitását, így megerősítettük, hogy a remdezivir az ABCB1 transzportált szubsztrátja. Az ABCC1-mediálta ETBG transzportot a remdezivir stimulálta, melynek háttérében allosztérikus kooperáció állhat (275).

A remdezivir maximális plazmakoncentrációja 4-9 μ M körül volt egészségesekben (205), betegeken ettől eltérő is lehet (276). A gyógyszer plazma-féléletideje hozzávetőlegesen 1 óra (205).

Nagy affinitással hatott kölcsön az OATP1A2 és OATP2B1 transzporterekkel, illetve gátolta az OATP1B1 és OATP1B3 transzportereket is. Mások később megerősítették eredményeinket, s leírták azt is, hogy a remdezivir az OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 gyenge szubsztrátja, de klinikailag releváns koncentrációban egyik transzporter sem játszhat szerepet hepatocelluláris felvételében, mert csak magas alkalmazott koncentrációban tudtak aktív, OATP-mediált transzportot mérni in vitro (277).

Azt is leírtuk, hogy az OCT1- és MATE1-mediált metformin transzportját gátolta a remdezivir 6,1 μ M és 2,3 μ M IC₅₀ értékekkel. Habár a fenti transzporterekre kalkulált IC₅₀ értékek közel a remdezivir legmagasabb plazmakoncentrációjának felelnek meg, rövid féléletideje miatt annak a lehetősége, hogy e transzporterekkel összefüggésben klinikailag szignifikáns gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokat okozzon, igen csekély.

A remdezivir gátolta az NTCP- és ABCB11-mediált taurokolát transzportot, de olyan magas koncentrációban, ami in vivo talán nem elérhető.

Szelektív gátlást tapasztaltunk a vizsgált ABCC fehérjékre. A remdezivir nem hatott kölcsön az ABCC2 és ABCC3 fehérjékkel, viszont potensen gátolta a nukleozid analóg gyógyszerek

transzportjában szerepet játszó ABCC4 transzportert (278, 279). ABCC4-hez kapcsolt klinikailag releváns gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásról nem számoltak még be. Multispecifikus, a főbb barriereken kifejeződő (232, 280, 281) transzporterként közreműködhet mellékhatások kialakulásában és potenciális gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokban, hisz a COVID-19-hez társuló kórképek kezelésére olyan ABCC4 szubsztrát és inhibitor gyógyszereket is alkalmaznak, mint a cefalosporinok, furoszemid, hidroklorotiazid, olmeszartan, nem-szteroid gyulladáscsökkentők, kardiovaszkuláris szerek (282-285).

A COVID-19 betegséggel kezelt betegcsoportban magasabb a gyógyszer okozta májkárosodás incidenciája összehasonlítva más betegséggel kórházban kezelt páciensekkel (286). Több vizsgálatban számoltak be arról, hogy a remdezivir hepatotoxikus (286-289). Bár leírtuk a remdezivir kölcsönhatását több hepatikus transzporterrel, a transzporter hatások jelentősége a parenterálisan adott remdezivir diszpozíciójára minimális lehet.

A remdezivir és egyéb COVID-19 terápiájában használt gyógyszerek közrejátszhatnak a kezelés nyomán fellépő májkárosodás kialakulásában. Nem áll rendelkezésre elég adat, hogy a következményes májkárosodás és COVID-19 mortalitás kapcsolatát megítéljük. Ugyanakkor a DILI jelentősen megnöveli a kórházi kezelés időtartamát, így egyéb komorbiditás, nozokomiális fertőzések léphetnek fel. Szocioökonómiai szempontból is jelentős, hisz az amúgy is túlterhelt egészségügyi rendszerre újabb terhet ró. Összegezve, az in vitro transzporter kölcsönhatás eredményeink hozzájárulhatnak a COVID-19 betegség és komorbid állapotok terápiás kezelésének optimalizálásához (203) (204).

6.3. Az ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatása

A gyógyszer okozta májkárosodás pácienseket, egészségügyi dolgozókat, gyógyszerfejlesztőket és gyógyszerhatóságokat egyaránt érintő probléma. Ugyan a kevésbé súlyos májkárosodást szenvedett betegek teljes gyógyulása várható, de a folyamat elhúzódó és a páciensek ötöde még 6 hónap múltán is mutat májkárosodásra utaló jeleket (290). A gyógyszeres májkárosodás, - elsősorban az idioszinkrázis formája - a gyógyszerfejlesztés klinikai fázis leállításának leggyakoribb oka (291). A klinikailag koleztatikusnak definiált

DILI a hepatociták kanalikuláris membránjának vagy a kolangiociták szelektív károsodásával jár. A károsodást okozhatja a gyógyszerek általi ABCB4 gátlás (163, 292). Ezidáig több módszerrel vizsgálták már az ABCB4 fehérjét, de korlátozott adat áll rendelkezésre az ABCB4 gyógyszerkölsönhatásokban betöltött szerepéről, jelentőségéről (39, 163). Más efflux transzporterekhez képest kevés gyógyszer szubsztrátját és inhibitorát azonosították. Ezért olyan esszét fejlesztettünk, mely lehetővé teszi az ABCB4 aktivitás más transzporterektől, elsősorban az Abcb1 fehérjétől független vizsgálatát.

Első lépésként az átfedő szubsztrátspecifitás miatt létrehoztunk egy Abcb1KO-MDCKII sejtvonalat, melyet korábban eredményesen használtuk *in vitro* sejtes vizsgálatokhoz, s vizsgálatainkkal alátámasztottuk, hogy a humán ABCB1 játszik szerepet a maravirok fetomaternalis transzportjában. Eredményeink alapján sem az ABCG2, sem az ABCC2 fehérjék nem befolyásolják a maravirok farmakokinetikáját, ugyanis az endogén kutya Abcb1 transzport aktivitását detektálták a humán ABCG2 és ABCC2 fehérjét expresszáló MDCKII sejtekben (293).

A fenti, endogén kutya Abcb1 aktivitással nem rendelkező anyasejtekben ABCB4 fehérjét expresszáltattunk. Az ABCB4 fiziológias szubsztrátjai foszfolipidek (PC), melyek mérése körülményes, viszont az ABCB4 gyógyszer szubsztrát, digoxin transzport mérése könnyebben kivitelezhető, így rendszerünket digoxinnal validáltuk. Ismert, hogy a különböző DILI kategóriába sorolt gyógyszerek májsejt alapú rendszerekben befolyásolják az ABCB4 működését. Az általunk létrehozott esszében a legjelentősebb DILI-t okozó gyógyszerek közül az itrakonazol és ketokonazol, a ritonavir és a szakvinavir potens gátlószerek bizonyultak. Az itrakonazol az alább részletezett irodalmi adatokkal összehasonlítva nagyságrenddel alacsonyabb, 0,17 μM -os IC_{50} értékkel gátolta a digoxin transzportját, ugyanakkor 1 μM IC_{50} értékkel gátolta a ^{14}C -PC transzportját LLC-PK1-ABCB4 sejtekben (161), 10 μM végkoncentrációban alkalmazva 30% gátlást fejtett ki LLC-PK1-ABCB4 sejtekben a C6-NBD-PC szekréciójára (162) és humán hepatocitákban 2,1 μM IC_{50} értéket határoztak meg rá PC transzport vizsgálatokban (163). A ketokonazol az irodalmi adatokkal összevetve tízszer alacsonyabb koncentrációban (0,56 μM) gátolta az ABCB4 aktivitását (5 μM (39), 5,6 μM (163)). A ritonavir 0,73 μM koncentrációban gátolta 50 %-ban a digoxin transzportját, tízszer potensebb ABCB4 gátlószerek bizonyul ebben a

rendszerben a hepatocita eredményekkel összehasonlítva (9,6 μM (163) és 11,3 μM (39)), s ezt tapasztaltuk a sakvinavir esetén is (1,4 μM szemben a 12,9 μM értékkel (163)).

Ebben a csoportban eddig még irodalomban nem leírt ABCB4 gátlószerként azonosítottunk tirozin-kináz inhibitorokat (imatinib, erlotinib, sorafenib és gefitinib) és antivirális szereket (lopinavir, darunavir és azunaprevir) is. A fenti tirozin-kináz gátlók közül a gefitinibet, mint ABCB4 szubsztrátot is azonosítottuk.

A metotrexátra hepatocita vizsgálatokban 3,1 μM IC_{50} értéket határoztak meg (39), ezzel szemben az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 sejtes vizsgálatban a metotrexát nem hatott kölcsön az ABCB4 fehérjével. Ennek hátterében az állhat, hogy a metotrexát hidrofíl molekula, így nem képes átjutni a sejtek membránján csak valamilyen SLC fehérje segítségével, s az MDCKII sejtekben nem expresszálódnak ilyen endogén, gyógyszertranszportot mediáló SLC transzporterek. Benzbromaron esetén épp fordított jelenséget figyeltünk meg, a 0,4 μM (39) IC_{50} érték helyett nagyságrenddel magasabb (19,89 μM) IC_{50} értéket határoztunk meg. Ennek oka az lehet, hogy a benzbromaron májsejtekben metabolikusan aktiválódik CYP enzimek segítségével, s toxikus hatását elsősorban ezek a metabolitok okozzák (294). Az acetilszalicilsav, amiodaron, karbamazepin, levofloxacin és troglitazon nem befolyásolták az ABCB4-mediált digoxin transzportot, eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal (39).

A DILI kauzalitás szerint kevésbé jelentős gyógyszercsoportból a ABCB1 modulátor amlodipin (295) gyenge kölcsönhatást mutatott az ABCB4 fehérjével, míg az ABCB4 szubsztrátként azonosított ivermektin (159) potens gátlószernek bizonyult. A fenofibrát és pantoprazol az általunk alkalmazott koncentrációkban nem mutattak kölcsönhatást az ABCB4 fehérjével, míg a karvedilol potens gátlószernek bizonyult.

A DILI-t nem okozó minoxidil és furoszemid nem ABCB4 kölcsönhatók, a májsejt alapú esszéekben tapasztaltaktól nem mutattak eltérést (39).

Ismert ABCB1 kölcsönható gyógyszerek ABCB4 kölcsönhatását is vizsgáltuk. Az ABCB1 szubsztrát és inhibitor verapamil nagyságrenddel alacsonyabb IC_{50} értékkel gátolta a digoxin transzportját az irodalmi adatokkal összehasonlítva (39, 159, 163). Azt találtuk, hogy a már korábban leírt valsopodar (159) potens ABCB4 gátlószernek, s a zosuquidar, elakridar, mibefradil is erős koncentrációfüggő gátlóhatást váltottak ki. A kinidin és prazosin gyenge ABCB4

szubsztrátoknak bizonyultak, viszont potensen gátolják az ABCB4-mediált digoxin transzportot. A ciclosporin A szintén gátlószernek bizonyult, He és munkatársai viszont nem azonosították gátlószerként (163).

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 esszé alkalmas gyógyszerek ABCB4 modulálásán keresztüli DILI potenciáljának vizsgálatára, az esszétípus korlátainak figyelembevételével (208).

6.4. A baikalin és OATP transzporterek kölcsönhatása

A gyógyszer okozta májkárosodás 20%-át okozzák gyógynövénykivonatok és étrendkiegészítők (296), s a rendelkezésre álló, egyre nagyobb mennyiségű információ alapján egyes növényi hatóanyagok a transzporterek szintjén kölcsönhatnak gyógyszerekkel a vékonybélben is (297, 298). In vitro transzporter vizsgálataink alkalmasak nemcsak gyógyszerek, hanem egyéb xenobiotikum vizsgálatok elvégzésére is, és a transzporter-xenobiotikum kölcsönhatások feltérképezése segítheti az in vivo gyógynövény-gyógyszer interakciók (299, 300) megértését. A kínai gyógyászatban ősidők óta használt *Scutellaria baicalensis* bioaktív anyagainak terápiás hatásairól számos közlemény jelent meg (301). A bajkái csucsóka kivonatát a hagyományos kínai orvoslásban többek közt máj- és tüdőpanaszok kezelésére is használják. A bajkái csucsóka alkalmazásakor leírtak gyógynövény hatóanyag-gyógyszer kölcsönhatásokat mind klinikai, mind preklinikai vizsgálatokban (299). Egy keresztmetszeti vizsgálatban a különböző OATP1B1 haplotípusú egészséges emberekben a baikalin csökkentette a rozuvasztatin plazmakoncentrációját, OATP1B1 haplotípustól függően (187). Preklinikai, patkányokon végzett kísérletek során azt találták, hogy a baikalin serkenti az influenza kezelésére alkalmazott ozeltamivir felszívódását (302). Korábban már leírták a baikalin és baikalein enterohepatikus körforgásában szerepet játszó főbb efflux transzportereket (186). S ismert volt az is, hogy a baikalin kölcsönhat az OATP1B1 fehérjével, ezért in vitro megvizsgáltuk, hogy az OATP1B1 fehérje mellett az OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék is szerepet játszhatnak-e a baikalin májba történő felvételéért. In vitro kísérleteink alapján a hepatociták bazolaterális

SLC transzporterei közül a vérből a májba történő baikalin felvételért az OATP2B1 fehérje lehet felelős.

A baikalin és baikalein farmakokinetikájának és biohasznosulásának megismerése elengedhetetlen a potenciális gyógyszerkölsönhatások megértéséhez, s eredményeink ehhez hozzájárulhatnak (211).

7. Következtetések

7.1. Újonnan fejlesztett Mycobacterium tuberculosis topoizomeráz-I inhibitorok kölcsönhatásának vizsgálata humán ABC transzportfehérjékkel

A Vichem Chemie Kutató Kft. munkatársai által fejlesztett MtTopo-I inhibitorok vizsgálatakor azt találtuk, hogy:

- a VCC389777 molekula szignifikánsan stimulálta az ABCG2 ATPáz aktivitását, s ebből arra következtethettünk, hogy a VCC389777 molekula transzportált szubsztrát. További három anyag az ABCB1 ATPáz aktivitását stimulálta, így ezek is transzportált szubsztrátok lehetnek (VCC389777, VCC979812, és VCC450822). A VCC450822 vegyület a lassan transzportált szubsztrátokra vagy inhibitorokra jellemző módon hatott kölcsön az ABCB1 fehérjével;

- a sejtes esszéekben a VCC891909 vegyület kivételével az összes molekula gátolta a sejtekből az ABC transzporter-mediálta festék kipumpálását. A VCC450327 molekula nem hatott kölcsön az ABCB1 fehérjével ebben az esszében, s az ABCG2 kölcsönhatás is csak mérsékelt volt;

- toxicitás vizsgálatokban a VCC891909 vegyület egyik sejtvonalra sem fejtett ki toxikus hatást. A VCC480522, VCC340963 és VCC478498 vegyületek toxikusak, toxicitásukat az ABCB1 és ABCG2 fehérje expressziója nem befolyásolta.

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a humán sejtekre toxikus, de antimikrobiális hatást kifejtő VCC450822, VCC340963 és VCC478498 vegyületek valószínűleg nem alkalmas jelöltek a további gyógyszerfejlesztésre. A VCC891909 vegyület kedvező tulajdonságokkal bír, s potenciális gyógyszerjelölt lehet, mert hatékonyan gátolta az MtTopo-I enzimet, antimikrobiális hatást mutatott anélkül, hogy kölcsönhatna a vizsgált humán ABC transzporterekkel, s toxikus hatást fejtett volna ki az alkalmazott sejtvonalakra.

7.2. A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek DDI rizikójának meghatározása

A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek transzporter kölcsönhatásainak vizsgálata során az alábbi eredményeket kaptuk és az alábbi következtetésekre jutottunk:

- a favipiravir nem hatott kölcsön egyik általunk vizsgált transzporter fehérjével sem;
- a klorokin és hidroxiklorokin magas oldhatóságú és magas permeabilitású gyógyszerek, így farmakokinetikájukat a transzporterek kevésbé befolyásolják, Nem meglepő, hogy a klorokin és hidroxiklorokin nem hatottak kölcsön az ABCB1, ABCG2 és ABCC1 fehérjékkel. Gátolták viszont az OATP1A2 és OATP2B1 transzportereket. Eredményeink megerősítik azt a feltételezést, miszerint a hosszútávú klorokin/hidroxiklorokin kezelés okozta retinopátia kialakulásának oka részben az OATP1A2-mediálta all-transz-retinol felvétel gátlása;
- az ivermektin gátolta az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 transzporterek működését. Az in vitro kísérleti eredmények kvalitatív vagy kvantitatív átültetését az in vivo hatások előrejelzésére in vitro-in vivo extrapolációval elvégeztük, s mind az intesztinális ABCB1 és ABCG2, mind a vér-agy gáton, májban, vesében expresszálandó ABCB1 és ABCG2 fehérjék vonatkozásában olyan hányadosokat kaptunk, melyek azt erősítik meg, hogy az ivermektin klinikailag jelentős gyógyszerkölsönhatást okoz. A MATE1, OCT1 és NTCP transzporterekkel nem találtunk kölcsönhatást. Az ivermektin gátolta az általunk vizsgált OATP fehérjék működését, s az ABCC2 és ABCC3, ABCB11 és ABCB4 efflux pumpák is befolyásolhatják az ivermektin fiziológiás barriereken keresztüli fluxusát. Az irodalomban elsőként leírtuk az OATP1A2 és ivermektin kölcsönhatását, valamint azonosítottuk, mint ABCB4 gátlószert;
- a lopinavir/ritonavir ABCB1 és ABCG2 kölcsönhatások in vivo kiterjesztve messze meghaladták az alsó küszöbértéket, ezért az ABCB1 és ABCG2 transzporterek gátlása releváns tényező lopinavir/ritonavir gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás kialakulásában. A DDI rizikó becslés során az OATP1B1 kölcsönhatásra kalkulált R érték 2,39, az OATP1B3 kölcsönhatásra 1,74, így in vivo befolyásolhatják más egyidejűleg alkalmazott gyógyszerek farmakinetikáját. A lopinavir és ritonavir gátolták az ABCB11 és ABCB4 fehérjéket, ABCB11-mediálta epesav transzport és az ABCB4-mediálta foszfolipid szekréció egyidejű gátlása a gyógyszer okozta kolesztázis rizikófaktora. A ritonavir és lopinavir csak olyan magas koncentrációban gátolták az ABCC3 és ABCC4 fehérjéket, ami in vivo valószínűleg nem elérhető. Gátolták az NTCP, OCT1 és MATE1 fehérjéket, melyek szimultán gátlása befolyásolhatja többek közt a metformin farmakokinetikáját;

- a remdezivir az ABCB1 transzportált szubsztrátja. Az ABCC1-mediálta ETBG transzportot a remdezivir stimulálta, az ABCG2 fehérjével nem hatott kölcsön. Potensen gátolta az OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1 és OATP1B3 transzportereket. Azt is leírtuk, hogy az OCT1- és MATE1-mediált metformin transzportját gátolta a remdezivir. A remdezivir gátolta az NTCP- és BSEP-mediált taurokolát transzportot, de olyan magas koncentrációban, ami in vivo talán nem elérhető. A remdezivir nem hatott kölcsön az ABCC2 és ABCC3 fehérjékkel, viszont potensen gátolta az ABCC4 transzportert. Habár a fenti transzporterekre kalkulált IC_{50} értékek közel a remdezivir legmagasabb plazmakoncentrációjának felelnek meg, rövid féléletideje miatt annak a lehetősége, hogy e transzporterekkel összefüggésben klinikailag szignifikáns gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokat okozzon, igen csekély. Igazoltuk, hogy különböző komplexitású módszerek barrierspecifikus integrációjával gyógyszerek intesztinális felszívódásának, hepatikus exkréciójának, vér-agy gát penetrációjának és proximális tubuluson keresztüli szekréciójának vizsgálatával mechanisztikus és relevancia adatok egyaránt nyerhetők.

7.3. Nem-májsejt alapú tesztrendszer létrehozása ABCB4 fehérje és gyógyszerek kölcsönhatásának vizsgálatára

Munkánk a következő eredményekkel zárult:

- az Abcb1KO-MDCKII sejtvonalat eredményesen használtuk Abcb1 szubsztrátok transzportjának összehasonlítására a vad típusú, kutya Abcb1 fehérjét kifejező MDCKII sejtvonallal;
- sikeresen létrehoztunk egy olyan ABCB4-expresszálo sejtvonalat, melyben endogén kutya Abcb1 kölcsönhatás nélkül vizsgálhatjuk a potenciális ABCB4 kölcsönható gyógyszereket és kidolgoztunk egy, a digoxin vektoriális transzport gátlásán alapuló esszét a fehérje vizsgálatára;
- megvizsgáltuk, hogy az ABCB4 fehérje képes-e ABCB1 szubsztrátok transzportjára, s azt találtuk, hogy a digoxin mellett a prazozin is az ABCB4 szubsztrátja;
- DILI kauzalitás alapján csoportokba osztott gyógyszerek vizsgálatakor az irodalmi adatokkal összhangban álltak eredményeink;

- eddig még irodalomban nem leírt potens ABCB4 gátlószerként azonosítottunk tirozin-kináz inhibitorokat (imatinib, erlotinib, sorafenib és gefitinib), antivirális szereket (lopinavir, darunavir és azunaprevir) és ABCB1 gátlószereket is;

- a gefitinibet, mint ABCB4 szubsztrátot azonosítottuk.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 esszé alkalmas gyógyszerek ABCB4 modulálásán keresztüli DILI potenciáljának vizsgálatára, az esszétípus korlátainak figyelembevételével.

7.4. A baikalin kölcsönhatása OATP transzporterekkel

A baikalin vizsgálatok azt találtuk, hogy:

- a baikalin az OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék szubsztrátja;

- affinitása nagyobb az OATP2B1 fehérjéhez, így a májba történő baikalin felvételért az OATP2B1 fehérje lehet felelős.

Megmutattuk, hogy in vitro transzporter vizsgálatunk alkalmasak nemcsak gyógyszerek, hanem növényi hatóanyagok transzportfolyamatainak vizsgálatára is, és a transzporter-xenobiotikum kölcsönhatások feltérképezése segítheti az in vivo gyógnövény-gyógyszer interakciók megértését, s az így kapott mechanisztikus adatok felvetik a lehetőségét a fejlesztések racionalizálásának.

7.5. Összegzés

Összefoglalva munkánk során sikeresen alkalmaztunk transzporter esszéket a korai gyógyszerfejlesztés szakaszában. Megmutattuk, hogy a transzporter vizsgálatok használhatóak különböző testidegen anyagok (gyógyszermolekulák, növényi hatóanyagok) transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére és ADMETox sajátosságainak megértésére, s hogy in vitro módszerek felhasználásával hogyan lehet a mechanizmus és in vivo relevancia kérdését megválaszolni.

Új tesztrendszert fejlesztettünk, mely magába foglalta az expressziós rendszer optimalizálását, a szubsztrát próbák és inhibitorok jellemzését, és az esszé felhasználhatósági korlátainak tanulmányozását.

8. Összefoglalás

Az SLC és ABC transzporterek fontos szerepet játszanak a gyógyszerek felszívódásában, disztribúciójában és kiválasztásában, toxicitásuk befolyásolásában. Az utóbbi években számos, a gyógyszer ADMETox folyamatokban szerepet játszó transzportert karakterizáltak, in vitro és in vivo módszereket fejlesztettek vizsgálatukra, a tudományterület dinamikusan fejlődik.

In vitro transzporter esszéket használunk, hogy megállapítsuk egy új vegyület transzporter-szubsztrát affinitását vagy inhibitor potenciálját. A korai felfedezés szakaszában a nagy áteresztőképességű ATPáz és vezikula transzport esszék az elterjedtek, míg a gyógyszerjelölt molekula választásakor rendszerint már sejtalapú efflux és uptake esszéket használnak, s a klinikai gyógyszerkölcsönhatások feltérképezésére is elsősorban sejtalapú esszék az uralkodók.

Munkánk alapvetően arra irányult, hogy megértsük, emberben milyen kölcsönhatások határozzák meg a gyógyszerjelölt molekulák és gyógyszerek farmakokinetikáját, és hogy bemutassuk a gyógyszerkutatás különböző fázisait segítő, gyógyszer-transzporter kölcsönhatás mérésére és értelmezésére alkalmas, a vizsgálatok mechanisztikus szempontjai szerint előnyös tulajdonságokkal rendelkező tesztrendszerek használatát.

Ennek során megmutattuk a nagy áteresztőképességű ATPáz esszék gyakorlati hasznát a korai gyógyszerfejlesztés folyamatában a potenciális antituberkulotikumok esetében. Bemutattuk már használatban lévő szerek új terápiás alkalmazása során a transzporterek szintjén megvalósuló gyógyszerkölcsönhatások lehetőségét. Olyan olcsó, gyors, nem májsejt alapú tesztrendszert hoztunk létre, mely alkalmas a gyógyszerek ABCB4 fehérje kölcsönhatás feltérképezésére. Megmutattuk, hogy a transzporter-növényi hatóanyag kölcsönhatások ismerete előnyös lehet az in vivo gyógnövény-gyógyszer interakciók megértésében, s a mechanisztikus adatok hasznosak lehetnek a gyógyszernek nem minősülő szerek fejlesztésében is.

Elért eredményeink és további kutatásaink lehetőséget adnak még pontosabb, a gyógyszerkölcsönhatásokat jobban előrejelző rendszerek fejlesztésére.

9. Summary

SLC and ABC transporters play an important role in the absorption, distribution, and excretion of drugs, influencing their toxicity. In recent years, several transporters involved in drug ADMETox processes have been characterized, *in vitro* and *in vivo* methods have been developed for their investigation, and the scientific field is developing dynamically.

In vitro transporter assays are used to determine the transporter-substrate affinity or inhibitory potential of a new compound. In the early discovery phase, high-throughput (HT) ATPase and vesicle transport assays are widespread, while cell-based efflux and uptake assays are usually used when choosing a drug candidate molecule, furthermore cell-based assays are also prevalent for exploring clinical drug interactions.

Basically, our work was aimed at understanding what interactions determine the pharmacokinetics of drug candidate molecules and drugs in humans. The main goal was to demonstrate the use of test systems suitable for measuring and interpreting drug-transporter interactions with advantageous properties based on mechanistic aspect of the studies which support the different phases of drug discovery.

In doing so, we demonstrated the practical usefulness of HT ATPase assays in the process of early drug development for potential antituberculosic. We demonstrated the possibility of drug interactions at the transporter level during the new therapeutic application of drugs already in use with another indication. We have created a cheap, fast, non-liver cell-based test system that is suitable for exploring the ABCB4 protein interaction of drugs. We have shown that knowledge of transporter-plant active substance interactions can be beneficial in understanding *in vivo* herb-drug interactions, and mechanistic data can also be useful in the development of products and substances that do not qualify as drugs. Our results and further research provide an opportunity to develop more accurate systems that better predict drug interactions.

10. Irodalomjegyzék

1. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26.
2. Pedersen PL. Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr.* 2005;37(6):349-57.
3. Roux B. Ion channels and ion selectivity. *Essays Biochem.* 2017;61(2):201-9.
4. Li Y, Lu J, Paxton JW. The role of ABC and SLC transporters in the pharmacokinetics of dietary and herbal phytochemicals and their interactions with xenobiotics. *Curr Drug Metab.* 2012;13(5):624-39.
5. Zolk O, Fromm MF. Transporter-mediated drug uptake and efflux: important determinants of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(6):798-805.
6. Zamek-Gliszczyński MJ, Lee CA, Poirier A, Bentz J, Chu X, Ellens H, Ishikawa T, Jamei M, Kalvass JC, Nagar S, Pang KS, Korzekwa K, Swaan PW, Taub ME, Zhao P, Galetin A. ITC recommendations for transporter kinetic parameter estimation and translational modeling of transport-mediated PK and DDIs in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(1):64-79.
7. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005;28(3):249-68.
8. Li R, Niosi M, Johnson N, Tess DA, Kimoto E, Lin J, Yang X, Riccardi KA, Ryu S, El-Kattan AF, Maurer TS, Tremaine LM, Di L. A Study on Pharmacokinetics of Bosentan with Systems Modeling, Part 1: Translating Systemic Plasma Concentration to Liver Exposure in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(4):346-56.
9. Dingemans J, van Giersbergen PL. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(15):1089-115.
10. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-66.

11. Pizzagalli MD, Bensimon A, Superti-Furga G. A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *Febs j.* 2021;288(9):2784-835.
12. [Available from: <https://www.genenames.org/>].
13. Xie T, Zhang Z, Fang Q, Du B, Gong X. Structural basis of substrate recognition and translocation by human ABCA4. *Nat Commun.* 2021;12(1):3853.
14. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(1):93-115.
15. Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, Ashcroft FM. Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1514):257-67.
16. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 1990;346(6282):362-5.
17. Klein I, Sarkadi B, Váradi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1461(2):237-62.
18. Antoniou AN, Ford S, Pilley ES, Blake N, Powis SJ. Interactions formed by individually expressed TAP1 and TAP2 polypeptide subunits. *Immunology.* 2002;106(2):182-9.
19. Velamakanni S, Wei SL, Janvilisri T, van Veen HW. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39(5-6):465-71.
20. Albrecht C, Viturro E. The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch.* 2007;453(5):581-9.
21. Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K. The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:57-71.
22. Akiyama M. ABCA12 mutations and autosomal recessive congenital ichthyosis: a review of genotype/phenotype correlations and of pathogenetic concepts. *Hum Mutat.* 2010;31(10):1090-6.

23. Fasano T, Zanoni P, Rabacchi C, Pisciotta L, Favari E, Adorni MP, Deegan PB, Park A, Hlaing T, Feher MD, Jones B, Uzak AS, Kardas F, Dardis A, Sechi A, Bembì B, Minuz P, Bertolini S, Bernini F, Calandra S. Novel mutations of ABCA1 transporter in patients with Tangier disease and familial HDL deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012;107(3):534-41.
24. Ling V. Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells. *Can J Genet Cytol.* 1975;17(4):503-15.
25. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455(1):152-62.
26. Staud F, Ceckova M, Micuda S, Pavek P. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol.* 2010;596:199-222.
27. Patel KJ, Tannock IF. The influence of P-glycoprotein expression and its inhibitors on the distribution of doxorubicin in breast tumors. *BMC Cancer.* 2009;9:356.
28. Shen F, Chu S, Bence AK, Bailey B, Xue X, Erickson PA, Montrose MH, Beck WT, Erickson LC. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):95-102.
29. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1179-236.
30. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science.* 2009;323(5922):1718-22.
31. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(13):917-31.
32. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 1999;104(2):147-53.
33. Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch.* 2007;453(5):601-10.

34. Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(201):205-59.
35. Prescher M, Kroll T, Schmitt L. ABCB4/MDR3 in health and disease - at the crossroads of biochemistry and medicine. *Biol Chem*. 2019;400(10):1245-59.
36. Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, Strautnieks S, Thompson RJ, Lammert F, Kubitz R, Keitel V, Glantz A, Mattsson LA, Marschall HU, Molokhia M, Moore GE, Linton KJ, Williamson C. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut*. 2009;58(4):537-44.
37. Dawson S, Stahl S, Paul N, Barber J, Kenna JG. In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(1):130-8.
38. Kis E, Ioja E, Rajnai Z, Jani M, Méhn D, Herédi-Szabó K, Krajcsi P. BSEP inhibition: in vitro screens to assess cholestatic potential of drugs. *Toxicol In Vitro*. 2012;26(8):1294-9.
39. Aleo MD, Shah F, He K, Bonin PD, Rodrigues AD. Evaluating the Role of Multidrug Resistance Protein 3 (MDR3) Inhibition in Predicting Drug-Induced Liver Injury Using 125 Pharmaceuticals. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(5):1219-29.
40. Abele R, Tampé R. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:216-24.
41. Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*. 2014;289(45):30880-8.
42. He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem*. 2011;18(3):439-81.
43. Robbiani DF, Finch RA, Jäger D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*. 2000;103(5):757-68.
44. Qingyang Xiao YZ, Stefan Winter, Florian Büttner, Elke Schaeffeler, Matthias Schwab, Volker M Lauschke. Germline variant burden in multidrug resistance transporters is a therapy-specific predictor of survival in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2020;2020 May 1(146(9)):2475-87.

45. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 2007;453(5):643-59.
46. Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Ioja E, Vereczkey L, Krajcsi P. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev.* 2010;42(3):402-36.
47. Arana MR, Tocchetti GN, Rigalli JP, Mottino AD, Villanueva SS. Physiological and pathophysiological factors affecting the expression and activity of the drug transporter MRP2 in intestine. Impact on its function as membrane barrier. *Pharmacol Res.* 2016;109:32-44.
48. Ortiz DF, Li S, Iyer R, Zhang X, Novikoff P, Arias IM. MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte. *Am J Physiol.* 1999;276(6):G1493-500.
49. van de Wetering K, Burkon A, Feddema W, Bot A, de Jonge H, Somoza V, Borst P. Intestinal breast cancer resistance protein (BCRP)/Bcrp1 and multidrug resistance protein 3 (MRP3)/Mrp3 are involved in the pharmacokinetics of resveratrol. *Mol Pharmacol.* 2009;75(4):876-85.
50. Li CY, Basit A, Gupta A, Gáborik Z, Kis E, Prasad B. Major glucuronide metabolites of testosterone are primarily transported by MRP2 and MRP3 in human liver, intestine and kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;191:105350.
51. Jia YM, Zhu T, Zhou H, Ji JZ, Tai T, Xie HG. Multidrug Resistance-Associated Protein 3 Is Responsible for the Efflux Transport of Curcumin Glucuronide from Hepatocytes to the Blood. *Drug Metab Dispos.* 2020;48(10):966-71.
52. Patel M, Taskar KS, Zamek-Gliszczyński MJ. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *J Clin Pharmacol.* 2016;56 Suppl 7:S23-39.
53. Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* 2007;453(5):661-73.
54. Grube M, Hagen P, Jedlitschky G. Neurosteroid Transport in the Brain: Role of ABC and SLC Transporters. *Front Pharmacol.* 2018;9:354.
55. Meyer Zu Schwabedissen HE, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HK, Jedlitschky G. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a

transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am J Pathol.* 2005;166(1):39-48.

56. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 1999;59(1):175-82.

57. Favre G, Laurain A, Aranyi T, Szeri F, Fulop K, Le Saux O, Durantou C, Kauffenstein G, Martin L, Lefthériotis G. The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).

58. Baker A, Carrier DJ, Schaedler T, Waterham HR, van Roermund CW, Theodoulou FL. Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(5):959-65.

59. Ford RC, Hellmich UA. What monomeric nucleotide binding domains can teach us about dimeric ABC proteins. *FEBS Lett.* 2020;594(23):3857-75.

60. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2016;20(1):17-28.

61. Patel SB, Graf GA, Temel RE. ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols. *J Lipid Res.* 2018;59(7):1103-13.

62. Wang HH, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Recent Advances in the Critical Role of the Sterol Efflux Transporters ABCG5/G8 in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1276:105-36.

63. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001;61(8):3458-64.

64. Jani M, Ambrus C, Magnan R, Jakab KT, Beéry E, Zolnerciks JK, Krajcsi P. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch Toxicol.* 2014;88(6):1205-48.

65. Garibhsingh RA, Schlessinger A. Advances and Challenges in Rational Drug Design for SLCs. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(10):790-800.

66. Mikros E, Diallinas G. Tales of tails in transporters. *Open Biol.* 2019;9(6):190083.

67. Hediger MA, Clémenton B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):95-107.
68. Colas C, Ung PM, Schlessinger A. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. *Medchemcomm.* 2016;7(6):1069-81.
69. Shimada H, Moewes B, Burckhardt G. Indirect coupling to Na⁺ of p-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol.* 1987;253(5 Pt 2):F795-801.
70. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):121-38.
71. Wright EM. Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):183-96.
72. Motohashi H, Inui K. Multidrug and toxin extrusion family SLC47: physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):661-8.
73. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):413-35.
74. Nałęcz KA. Solute Carriers in the Blood-Brain Barrier: Safety in Abundance. *Neurochem Res.* 2017;42(3):795-809.
75. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(7):375-83.
76. Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 2015;121:24-30.
77. Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kühn L, Verrey F. Amino acid transport of γ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Embo j.* 1999;18(1):49-57.
78. Nguyen NNT, Lim YS, Nguyen LP, Tran SC, Luong TTD, Nguyen TTT, Pham HT, Mai HN, Choi JW, Han SS, Hwang SB. Hepatitis C Virus Modulates Solute carrier family 3 member 2 for Viral Propagation. *Sci Rep.* 2018;8(1):15486.

79. Kosugi S, Okamoto H, Tamada A, Sanchez-Franco F. A novel peculiar mutation in the sodium/iodide symporter gene in spanish siblings with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3830-6.
80. El-Gebali S, Bentz S, Hediger MA, Anderle P. Solute carriers (SLCs) in cancer. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):719-34.
81. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D789-98.
82. Santer R, Steinmann B, Schaub J. Fanconi-Bickel syndrome--a congenital defect of facilitative glucose transport. *Curr Mol Med.* 2002;2(2):213-27.
83. Kandasamy P, Gyimesi G, Kanai Y, Hediger MA. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(10):752-89.
84. Johnson EJ, Won CS, Köck K, Paine MF. Prioritizing pharmacokinetic drug interaction precipitants in natural products: application to OATP inhibitors in grapefruit juice. *Biopharm Drug Dispos.* 2017;38(3):251-9.
85. McFeely SJ, Wu L, Ritchie TK, Unadkat J. Organic anion transporting polypeptide 2B1 - More than a glass-full of drug interactions. *Pharmacol Ther.* 2019;196:204-15.
86. Unger MS, Mudunuru J, Schwab M, Hopf C, Drewes G, Nies AT, Zamek-Gliszczynski MJ, Reinhard FBM. Clinically Relevant OATP2B1 Inhibitors in Marketed Drug Space. *Mol Pharm.* 2020;17(2):488-98.
87. Adibi SA. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;2003 Nov(285(5)):G779-88.
88. Yang N, Dong YQ, Jia GX, Fan SM, Li SZ, Yang SS, Li YB. ASBT(SLC10A2): A promising target for treatment of diseases and drug discovery. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110835.
89. Wang Y, Cheetham AG, Angacian G, Su H, Xie L, Cui H. Peptide-drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;110-111:112-26.

90. Zheng X, Polli JE. Synthesis and in vitro evaluation of potential sustained release prodrugs via targeting ASBT. *Int J Pharm.* 2010;396(1-2):111-8.
91. van Ryn J, Goss A, Huel N, Wiene W, Priepke H, Nar H, Clemens A. The discovery of dabigatran etexilate. *Front Pharmacol.* 2013;4:12.
92. Sun X, Wang M, Wang M, Yao L, Li X, Dong H, Li M, Sun T, Liu X, Liu Y, Xu Y. Role of Proton-Coupled Monocarboxylate Transporters in Cancer: From Metabolic Crosstalk to Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:651.
93. Thwaites DT, Anderson CM. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol.* 2007;92(4):603-19.
94. Moss AM, Endres CJ, Ruiz-Garcia A, Choi DS, Unadkat JD. Role of the equilibrative and concentrative nucleoside transporters in the intestinal absorption of the nucleoside drug, ribavirin, in wild-type and Ent1(-/-) mice. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2442-9.
95. Hermann R, Krajcsi P, Fluck M, Seithel-Keuth A, Bytyqi A, Galazka A, Munafo A. Review of Transporter Substrate, Inhibitor, and Inducer Characteristics of Cladribine. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60(12):1509-35.
96. Mouly S, Paine MF. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res.* 2003;20(10):1595-9.
97. Benet LZ. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *J Pharm Sci.* 2013;102(1):34-42.
98. Wyen C, Fuhr U, Frank D, Aarnoutse RE, Klaassen T, Lazar A, Seeringer A, Doroshenko O, Kirchheiner JC, Abdulrazik F, Schmeisser N, Lehmann C, Hein W, Schömig E, Burger DM, Fätkenheuer G, Jetter A. Effect of an antiretroviral regimen containing ritonavir boosted lopinavir on intestinal and hepatic CYP3A, CYP2D6 and P-glycoprotein in HIV-infected patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84(1):75-82.
99. Niemi M, Tornio A, Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ, Backman JT. Itraconazole, gemfibrozil and their combination markedly raise the plasma concentrations of loperamide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62(6):463-72.

100. Gramatté T, Oertel R, Terhaag B, Kirch W. Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59(5):541-9.
101. Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res.* 1999;16(3):408-14.
102. Xu P, Zhou H, Li YZ, Yuan ZW, Liu CX, Liu L, Xie Y. Baicalein Enhances the Oral Bioavailability and Hepatoprotective Effects of Silybin Through the Inhibition of Efflux Transporters BCRP and MRP2. *Front Pharmacol.* 2018;9:1115.
103. Liang E, Proudfoot J, Yazdani M. Mechanisms of transport and structure-permeability relationship of sulfasalazine and its analogs in Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res.* 2000;17(10):1168-74.
104. Dahan A, Amidon GL. MRP2 mediated drug-drug interaction: indomethacin increases sulfasalazine absorption in the small intestine, potentially decreasing its colonic targeting. *Int J Pharm.* 2010;386(1-2):216-20.
105. Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(20):1651-6.
106. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol.* 2005;67(5):1758-64.
107. Yin J, Wang J. Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6(5):363-73.
108. Nigam SK, Bush KT, Bhatnagar V. Drug and toxicant handling by the OAT organic anion transporters in the kidney and other tissues. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007;3(8):443-8.
109. Burckhardt BC, Burckhardt G. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;146:95-158.
110. Motohashi H, Inui K. Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney. *Aaps j.* 2013;15(2):581-8.

111. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 2007;24(7):1227-51.
112. Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y, Omote H. Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(6):913-8.
113. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(2):359-71.
114. Bakos E, Evers R, Sinkó E, Váradi A, Borst P, Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol.* 2000;57(4):760-8.
115. Keppler D, Cui Y, König J, Leier I, Nies A. Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes. *Adv Enzyme Regul.* 1999;39:237-46.
116. Mizuno N, Takahashi T, Kusuhara H, Schuetz JD, Niwa T, Sugiyama Y. Evaluation of the role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the urinary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). *Drug Metab Dispos.* 2007;35(11):2045-52.
117. Pan G, Giri N, Elmquist WF. Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(7):1165-73.
118. Kiser JJ, Aquilante CL, Anderson PL, King TM, Carten ML, Fletcher CV. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;47(3):298-303.
119. Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH, Prieto JG. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(4):690-5.

120. Robieux I, Dorian P, Klein J, Chung D, Zborowska-Sluis D, Ogilvie R, Koren G. The effects of cardiac transplantation and cyclosporine therapy on digoxin pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol*. 1992;32(4):338-43.
121. Ding R, Tayrouz Y, Riedel KD, Burhenne J, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE. Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76(1):73-84.
122. Sun HL, Wu YW, Bian HG, Yang H, Wang H, Meng XM, Jin J. Function of Uric Acid Transporters and Their Inhibitors in Hyperuricaemia. *Front Pharmacol*. 2021;12:667753.
123. Terasaki T, Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx*. 2005;2(1):63-72.
124. Tsuji A. Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. *NeuroRx*. 2005;2(1):54-62.
125. Giacomini KM, Huang SM. Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(1):3-9.
126. Stieger B, Hagenbuch B. Recent advances in understanding hepatic drug transport. *F1000Res*. 2016;5:2465.
127. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37161-8.
128. Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, Yue W. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
129. Shen H, Lai Y, Rodrigues AD. Organic Anion Transporter 2: An Enigmatic Human Solute Carrier. *Drug Metab Dispos*. 2017;45(2):228-36.

130. Shin HJ, Anzai N, Enomoto A, He X, Kim DK, Endou H, Kanai Y. Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology*. 2007;45(4):1046-55.
131. Pelis RM, Wright SH. SLC22, SLC44, and SLC47 transporters--organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. *Curr Top Membr*. 2014;73:233-61.
132. Ballatori N, Christian WV, Wheeler SG, Hammond CL. The heteromeric organic solute transporter, OST α -OST β /SLC51: a transporter for steroid-derived molecules. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):683-92.
133. Hohenester S, Maillette de Buy Wenniger L, Jefferson DM, Oude Elferink RP, Beuers U. Biliary bicarbonate secretion constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in man. *Dig Dis*. 2011;29(1):62-5.
134. Yonezawa A, Inui K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Br J Pharmacol*. 2011;164(7):1817-25.
135. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461(2):377-94.
136. Jetter A, Kullak-Ublick GA. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res*. 2020;154:104234.
137. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(16):1295-302.
138. Dubin IN, Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1954;33(3):155-97.
139. Yin W, Xiang D, Wang T, Zhang Y, Pham CV, Zhou S, Jiang G, Hou Y, Zhu Y, Han Y, Qiao L, Tran PH, Duan W. The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):10791.
140. Malik MY, Jaiswal S, Sharma A, Shukla M, Lal J. Role of enterohepatic recirculation in drug disposition: cooperation and complications. *Drug Metab Rev*. 2016;48(2):281-327.

141. Zakrzewicz D, Geyer J. Multitasking Na(+)/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) as a Drug Target for HBV Infection: From Protein Engineering to Drug Discovery. *Biomedicines*. 2022;10(1).
142. Lu X, Liu L, Shan W, Kong L, Chen N, Lou Y, Zeng S. The Role of the Sodium-taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP) and Bile Salt Export Pump (BSEP) in Related Liver Disease. *Curr Drug Metab*. 2019;20(5):377-89.
143. Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010;30(2):125-33.
144. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48275-82.
145. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. 1996;87(3):507-17.
146. Smith AJ, de Vree JM, Ottenhoff R, Oude Elferink RP, Schinkel AH, Borst P. Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology*. 1998;28(2):530-6.
147. Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH, Borst P. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett*. 1994;354(3):263-6.
148. Prescher M, Smits SHJ, Schmitt L. Stimulation of ABCB4/MDR3 ATPase activity requires an intact phosphatidylcholine lipid. *J Lipid Res*. 2020;61(12):1605-16.
149. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 1993;75(3):451-62.
150. Small DM. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):4-6.

151. van der Blik AM, Kooiman PM, Schneider C, Borst P. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene*. 1988;71(2):401-11.
152. Buschman E, Gros P. The inability of the mouse *mdr2* gene to confer multidrug resistance is linked to reduced drug binding to the protein. *Cancer Res*. 1994;54(18):4892-8.
153. Januchowski R, Wojtowicz K, Andrzejewska M, Zabel M. Expression of MDR1 and MDR3 gene products in paclitaxel-, doxorubicin- and vincristine-resistant cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(1):111-7.
154. Němcová-Fürstová V, Kopperová D, Balušíková K, Ehrlichová M, Brynychová V, Václavíková R, Daniel P, Souček P, Kovář J. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;310:215-28.
155. Wen C, Fu L, Huang J, Dai Y, Wang B, Xu G, Wu L, Zhou H. Curcumin reverses doxorubicin resistance via inhibition the efflux function of ABCB4 in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):5162-8.
156. Hontecillas-Prieto L, Garcia-Dominguez DJ, Vaca DP, Garcia-Mejias R, Marcilla D, Ramirez-Villar GL, Saez C, de Álava E. Multidrug resistance transporter profile reveals MDR3 as a marker for stratification of blastemal Wilms tumour patients. *Oncotarget*. 2017;8(7):11173-86.
157. Olsen JA, Alam A, Kowal J, Stieger B, Locher KP. Structure of the human lipid exporter ABCB4 in a lipid environment. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(1):62-70.
158. Morita SY, Terada T. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int*. 2014;2014:954781.
159. Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B, Borst P. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem*. 2000;275(31):23530-9.
160. Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol*. 2005;43(2):342-57.
161. Yoshikado T, Takada T, Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Santa T, Yokota H, Yatomi Y, Yoshida H, Goto J, Tsuji S, Suzuki H. Itraconazole-induced cholestasis: involvement of

the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol Pharmacol.* 2011;79(2):241-50.

162. Mahdi ZM, Synal-Hermanns U, Yoker A, Locher KP, Stieger B. Role of Multidrug Resistance Protein 3 in Antifungal-Induced Cholestasis. *Mol Pharmacol.* 2016;90(1):23-34.

163. He K, Cai L, Shi Q, Liu H, Woolf TF. Inhibition of MDR3 Activity in Human Hepatocytes by Drugs Associated with Liver Injury. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(10):1987-90.

164. Morita SY, Kobayashi A, Takanezawa Y, Kioka N, Handa T, Arai H, Matsuo M, Ueda K. Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology.* 2007;46(1):188-99.

165. Stättermayer AF, Halilbasic E, Wrba F, Ferenci P, Trauner M. Variants in ABCB4 (MDR3) across the spectrum of cholestatic liver diseases in adults. *J Hepatol.* 2020;73(3):651-63.

166. Hendrickx R, Johansson JG, Lohmann C, Jenvert RM, Blomgren A, Börjesson L, Gustavsson L. Identification of novel substrates and structure-activity relationship of cellular uptake mediated by human organic cation transporters 1 and 2. *J Med Chem.* 2013;56(18):7232-42.

167. Balimane PV, Chong S, Patel K, Quan Y, Timoszyk J, Han YH, Wang B, Vig B, Faria TN. Peptide transporter substrate identification during permeability screening in drug discovery: comparison of transfected MDCK-hPepT1 cells to Caco-2 cells. *Arch Pharm Res.* 2007;30(4):507-18.

168. Pedersen JM, Matsson P, Bergström CA, Hoogstraate J, Norén A, LeCluyse EL, Artursson P. Early identification of clinically relevant drug interactions with the human bile salt export pump (BSEP/ABCB11). *Toxicol Sci.* 2013;136(2):328-43.

169. Volpe DA. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(1):91-103.

170. Romaine SP, Bailey KM, Hall AS, Balmforth AJ. The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J.* 2010;10(1):1-11.

171. Pardanani A, Harrison C, Cortes JE, Cervantes F, Mesa RA, Milligan D, Masszi T, Mishchenko E, Jourdan E, Vannucchi AM, Drummond MW, Jurgutis M, Kuliczowski K, Gheorghita E, Passamonti F, Neumann F, Patki A, Gao G, Tefferi A. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(5):643-51.
172. Zhang Q, Zhang Y, Diamond S, Boer J, Harris JJ, Li Y, Rupar M, Behshad E, Gardiner C, Collier P, Liu P, Burn T, Wynn R, Hollis G, Yeleswaram S. The Janus kinase 2 inhibitor fedratinib inhibits thiamine uptake: a putative mechanism for the onset of Wernicke's encephalopathy. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(10):1656-62.
173. Hazell AS, Afadlal S, Cheresch DA, Azar A. Treatment of rats with the JAK-2 inhibitor fedratinib does not lead to experimental Wernicke's encephalopathy. *Neurosci Lett.* 2017;642:163-7.
174. Talpaz M, Kiladjian JJ. Fedratinib, a newly approved treatment for patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. *Leukemia.* 2021;35(1):1-17.
175. Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(7):1247-54.
176. Sudsakorn S, Bahadduri P, Fretland J, Lu C. 2020 FDA Drug-drug Interaction Guidance: A Comparison Analysis and Action Plan by Pharmaceutical Industrial Scientists. *Curr Drug Metab.* 2020;21(6):403-26.
177. Bhoopathy S, Bode C, Naageshwaran V, Weiskircher-Hildebrandt E, Mukkavilli V, Hidalgo IJ. Case Study 7: Transporters Case Studies-In Vitro Solutions for Translatable Outcomes. *Methods Mol Biol.* 2021;2342:709-35.
178. Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem.* 1992;267(7):4854-8.
179. Qato DM, Wilder J, Schumm LP, Gillet V, Alexander GC. Changes in Prescription and Over-the-Counter Medication and Dietary Supplement Use Among Older Adults in the United States, 2005 vs 2011. *JAMA Intern Med.* 2016;176(4):473-82.

180. Brown AC. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. *Food Chem Toxicol.* 2017;107(Pt A):449-71.
181. Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(1):11-20.
182. Bailey DG, Dresser GK, Leake BF, Kim RB. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(4):495-502.
183. Lilja JJ, Backman JT, Laitila J, Luurila H, Neuvonen PJ. Itraconazole increases but grapefruit juice greatly decreases plasma concentrations of celiprolol. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(3):192-8.
184. Tapaninen T, Neuvonen PJ, Niemi M. Orange and apple juice greatly reduce the plasma concentrations of the OATP2B1 substrate aliskiren. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(5):718-26.
185. Akao T, Hanada M, Sakashita Y, Sato K, Morita M, Imanaka T. Efflux of baicalin, a flavone glucuronide of *Scutellariae Radix*, on Caco-2 cells through multidrug resistance-associated protein 2. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(1):87-93.
186. Kalapos-Kovács B, Magda B, Jani M, Fekete Z, Szabó PT, Antal I, Krajcsi P, Klebovich I. Multiple ABC Transporters Efflux Baicalin. *Phytother Res.* 2015;29(12):1987-90.
187. Fan L, Zhang W, Guo D, Tan ZR, Xu P, Li Q, Liu YZ, Zhang L, He TY, Hu DL, Wang D, Zhou HH. The effect of herbal medicine baicalin on pharmacokinetics of rosuvastatin, substrate of organic anion-transporting polypeptide 1B1. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(3):471-6.
188. Wei J, Liu R, Zhang J, Liu S, Yan D, Wen X, Tian X. Baicalin Enhanced Oral Bioavailability of Sorafenib in Rats by Inducing Intestine Absorption. *Front Pharmacol.* 2021;12:761763.

189. Ekins S, Godbole AA, Kéri G, Orfi L, Pato J, Bhat RS, Verma R, Bradley EK, Nagaraja V. Machine learning and docking models for Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017;103:52-60.
190. Telbisz Á, Hegedüs C, Váradi A, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C. Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(4):575-85.
191. Ujhelly O, Ozvegy C, Várady G, Cervenak J, Homolya L, Grez M, Scheffer G, Roos D, Bates SE, Váradi A, Sarkadi B, Német K. Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther*. 2003;14(4):403-12.
192. Nerada Z, Hegyi Z, Szepesi Á, Tóth S, Hegedüs C, Várady G, Matula Z, Homolya L, Sarkadi B, Telbisz Á. Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytometry A*. 2016;89(9):826-34.
193. Homolya L, Holló M, Müller M, Mechetner EB, Sarkadi B. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer*. 1996;73(7):849-55.
194. Szabó E, Türk D, Telbisz Á, Kucsma N, Horváth T, Szakács G, Homolya L, Sarkadi B, Várady G. A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190629.
195. Zámbo B, Móznér O, Bartos Z, Török G, Várady G, Telbisz Á, Homolya L, Orbán TI, Sarkadi B. Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(2):365-78.
196. Magda B, Márta Z, Imre T, Kalapos-Kovács B, Klebovich I, Fekete J, Szabó PT. Unexpected retention behavior of baicalin: Hydrophilic interaction like properties of a reversed-phase column. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;111:119-25.
197. Patik I, Székely V, Német O, Szepesi Á, Kucsma N, Várady G, Szakács G, Bakos É, Özvegy-Laczka C. Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing

the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Sci Rep.* 2018;8(1):2630.

198. Bakos É, Német O, Patik I, Kucsma N, Várady G, Szakács G, Özvegy-Laczka C. A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2. *Febs j.* 2020;287(12):2468-85.

199. Székely V, Patik I, Ungvári O, Telbisz Á, Szakács G, Bakos É, Özvegy-Laczka C. Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 2020;151:105395.

200. Fonseca JD, Knight GM, McHugh TD. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Infect Dis.* 2015;32:94-100.

201. Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* 2008;13(9-10):379-93.

202. Temesszentandrás-Ambrus C, Tóth S, Verma R, Bánhegyi P, Szabadkai I, Baska F, Szántai-Kis C, Hartkoorn RC, Lingerfelt MA, Sarkadi B, Szakács G, Örfi L, Nagaraja V, Ekins S, Telbisz Á. Characterization of new, efficient *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase-I inhibitors and their interaction with human ABC multidrug transporters. *PLoS One.* 2018;13(9):e0202749.

203. Telbisz Á, Ambrus C, Mózner O, Szabó E, Várady G, Bakos É, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C. Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. *Pharmaceutics.* 2021;13(1).

204. Ambrus C, Bakos É, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C, Telbisz Á. Interactions of anti-COVID-19 drug candidates with hepatic transporters may cause liver toxicity and affect pharmacokinetics. *Sci Rep.* 2021;11(1):17810.

205. Jorgensen SCJ, Kebriaei R, Dresser LD. Remdesivir: Review of Pharmacology, Pre-clinical Data, and Emerging Clinical Experience for COVID-19. *Pharmacotherapy.* 2020;40(7):659-71.

206. Di L, Whitney-Pickett C, Umland JP, Zhang H, Zhang X, Gebhard DF, Lai Y, Federico JJ, 3rd, Davidson RE, Smith R, Reyner EL, Lee C, Feng B, Rotter C, Varma MV,

- Kempshall S, Fenner K, El-Kattan AF, Liston TE, Troutman MD. Development of a new permeability assay using low-efflux MDCKII cells. *J Pharm Sci.* 2011;100(11):4974-85.
207. Gartzke D, Delzer J, Laplanche L, Uchida Y, Hoshi Y, Tachikawa M, Terasaki T, Sydor J, Fricker G. Genomic Knockout of Endogenous Canine P-Glycoprotein in Wild-Type, Human P-Glycoprotein and Human BCRP Transfected MDCKII Cell Lines by Zinc Finger Nucleases. *Pharm Res.* 2015;32(6):2060-71.
208. Temesszentandrás-Ambrus C, Nagy G, Bui A, Gáborik Z. A Unique In Vitro Assay to Investigate ABCB4 Transport Function. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5).
209. Zhang L, Li C, Lin G, Krajcsi P, Zuo Z. Hepatic metabolism and disposition of baicalein via the coupling of conjugation enzymes and transporters-in vitro and in vivo evidences. *Aaps j.* 2011;13(3):378-89.
210. Xu F, Li Z, Zheng J, Gee Cheung FS, Chan T, Zhu L, Zhuge H, Zhou F. The inhibitory effects of the bioactive components isolated from *Scutellaria baicalensis* on the cellular uptake mediated by the essential solute carrier transporters. *J Pharm Sci.* 2013;102(11):4205-11.
211. Kalapos-Kovács B, Juhász V, Temesszentandrás-Ambrus C, Magda B, Szabó PT, Antal I, Klebovich I, Krajcsi P. Baicalin is a substrate of OATP2B1 and OATP1B3. *Phytother Res.* 2018;32(8):1647-50.
212. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet.* 2019;393(10181):1642-56.
213. Al-Saeedi M, Al-Hajoj S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist.* 2017;10:333-42.
214. Te Brake LH, Russel FG, van den Heuvel JJ, de Knegt GJ, de Steenwinkel JE, Burger DM, Aarnoutse RE, Koenderink JB. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. *Tuberculosis (Edinb).* 2016;96:150-7.
215. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(10):1873-9.
216. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, Simmons NL. Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metab Dispos.* 2011;39(12):2321-8.

217. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2013;368(8):745-55.
218. Hartkoorn RC, Chandler B, Owen A, Ward SA, Bertel Squire S, Back DJ, Khoo SH. Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007;87(3):248-55.
219. van der Deen M, de Vries EG, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res*. 2005;6(1):59.
220. Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Müller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EG, Scheper RJ. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol*. 2002;55(5):332-9.
221. Nagaraja V, Godbole AA, Henderson SR, Maxwell A. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy. *Drug Discov Today*. 2017;22(3):510-8.
222. Zamek-Gliszczyński MJ, Taub ME, Chothe PP, Chu X, Giacomini KM, Kim RB, Ray AS, Stocker SL, Unadkat JD, Wittwer MB, Xia C, Yee SW, Zhang L, Zhang Y. Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(5):890-9.
223. Yoon JJ, Toots M, Lee S, Lee ME, Ludeke B, Luczo JM, Ganti K, Cox RM, Sticher ZM, Edpuganti V, Mitchell DG, Lockwood MA, Kolykhalov AA, Greninger AL, Moore ML, Painter GR, Lowen AC, Tompkins SM, Fearn R, Natchus MG, Plemper RK. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8).
224. Madelain V, Nguyen TH, Olivo A, de Lamballerie X, Guedj J, Taburet AM, Mentré F. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(8):907-23.
225. Dalvie D, Di L. Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacol Ther*. 2019;201:137-80.
226. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):722-7.

227. Roden DM, Harrington RA, Poppas A, Russo AM. Considerations for Drug Interactions on QTc in Exploratory COVID-19 Treatment. *Circulation*. 2020;141(24):e906-e7.
228. Chorin E, Dai M, Shulman E, Wadhvani L, Bar-Cohen R, Barbhaiya C, Aizer A, Holmes D, Bernstein S, Spinelli M, Park DS, Chinitz LA, Jankelson L. The QT interval in patients with COVID-19 treated with hydroxychloroquine and azithromycin. *Nat Med*. 2020;26(6):808-9.
229. Schäfer AM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Bien-Möller S, Hubeny A, Vogelgesang S, Oswald S, Grube M. OATP1A2 and OATP2B1 Are Interacting with Dopamine-Receptor Agonists and Antagonists. *Mol Pharm*. 2020;17(6):1987-95.
230. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(3):362-70.
231. Kinzi J, Grube M, Meyer Zu Schwabedissen HE. OATP2B1 - The underrated member of the organic anion transporting polypeptide family of drug transporters? *Biochem Pharmacol*. 2021;188:114534.
232. Ivanyuk A, Livio F, Biollaz J, Buclin T. Renal Drug Transporters and Drug Interactions. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(8):825-92.
233. Chan T, Zhu L, Madigan MC, Wang K, Shen W, Gillies MC, Zhou F. Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells. *Br J Pharmacol*. 2015;172(9):2343-53.
234. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 2001;120(2):525-33.
235. Guha S, Coffey EE, Lu W, Lim JC, Beckel JM, Laties AM, Boesze-Battaglia K, Mitchell CH. Approaches for detecting lysosomal alkalization and impaired degradation in fresh and cultured RPE cells: evidence for a role in retinal degenerations. *Exp Eye Res*. 2014;126:68-76.

236. Hubeny A, Keiser M, Oswald S, Jedlitschky G, Kroemer HK, Siegmund W, Grube M. Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2 in Red Blood Cells and Its Potential Impact on Antimalarial Therapy. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(10):1562-8.
237. Kellner U, Renner AB, Tillack H. Fundus autofluorescence and mfERG for early detection of retinal alterations in patients using chloroquine/hydroxychloroquine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3531-8.
238. Seideman P, Albertioni F, Beck O, Eksborg S, Peterson C. Chloroquine reduces the bioavailability of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. A possible mechanism of reduced hepatotoxicity. *Arthritis Rheum.* 1994;37(6):830-3.
239. Visentin M, Chang MH, Romero MF, Zhao R, Goldman ID. Substrate- and pH-specific antifolate transport mediated by organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1-SLCO2B1). *Mol Pharmacol.* 2012;81(2):134-42.
240. Ballent M, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(3):457-63.
241. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 1994;77(4):491-502.
242. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):727-33.
243. Lespine A, Dupuy J, Orłowski S, Nagy T, Glavinas H, Krajcsi P, Alvinerie M. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem Biol Interact.* 2006;159(3):169-79.
244. Pouliot JF, L'Heureux F, Liu Z, Prichard RK, Georges E. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(1):17-25.
245. Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, Dijkstra G, Roskams TA, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(6):710-20.

246. Adelsberger H, Lepier A, Dudel J. Activation of rat recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor by the insecticide ivermectin. *Eur J Pharmacol.* 2000;394(2-3):163-70.
247. Prough RA, Clark BJ, Klinge CM. Novel mechanisms for DHEA action. *J Mol Endocrinol.* 2016;56(3):R139-55.
248. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(1):65-91.
249. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22644-9.
250. Uzunova K, Filipova E, Pavlova V, Vekov T. Insights into antiviral mechanisms of remdesivir, lopinavir/ritonavir and chloroquine/hydroxychloroquine affecting the new SARS-CoV-2. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110668.
251. Arshad U, Pertinez H, Box H, Tatham L, Rajoli RKR, Curley P, Neary M, Sharp J, Liptrott NJ, Valentijn A, David C, Rannard SP, O'Neill PM, Aljayyousi G, Pennington SH, Ward SA, Hill A, Back DJ, Khoo SH, Bray PG, Biagini GA, Owen A. Prioritization of Anti-SARS-Cov-2 Drug Repurposing Opportunities Based on Plasma and Target Site Concentrations Derived from their Established Human Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;108(4):775-90.
252. Batteux B, Bodeau S, Gras-Champel V, Liabeuf S, Lanoix JP, Schmit JL, Andréjak C, Zerbib Y, Haye G, Masmoudi K, Lemaire-Hurtel AS, Bennis Y. Abnormal laboratory findings and plasma concentration monitoring of lopinavir and ritonavir in COVID-19. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(3):1547-53.
253. Schmitt C, Kaeser B, Riek M, Bech N, Kreuzer C. Effect of saquinavir/ritonavir on P-glycoprotein activity in healthy volunteers using digoxin as a probe. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010;48(3):192-9.
254. Perloff MD, Von Moltke LL, Marchand JE, Greenblatt DJ. Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. *J Pharm Sci.* 2001;90(11):1829-37.

255. Hartkoorn RC, Kwan WS, Shallcross V, Chaikan A, Liptrott N, Egan D, Sora ES, James CE, Gibbons S, Bray PG, Back DJ, Khoo SH, Owen A. HIV protease inhibitors are substrates for OATP1A2, OATP1B1 and OATP1B3 and lopinavir plasma concentrations are influenced by SLCO1B1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(2):112-20.
256. Annaert P, Ye ZW, Stieger B, Augustijns P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica*. 2010;40(3):163-76.
257. Alhadab AA, Salem AH, Freise KJ. Semimechanistic Modeling to Guide Venetoclax Coadministration with Ritonavir and Digoxin. *Clin Transl Sci*. 2020;13(3):555-62.
258. Macías J, Pinilla A, Lao-Dominguez FA, Corma A, Contreras-Macias E, González-Serna A, Gutierrez-Pizarra A, Fernández-Fuertes M, Morillo-Verdugo R, Trigo M, Real LM, Pineda JA. High rate of major drug-drug interactions of lopinavir-ritonavir for COVID-19 treatment. *Sci Rep*. 2020;10(1):20958.
259. Tupova L, Hirschmugl B, Sucha S, Pilarova V, Székely V, Bakos É, Novakova L, Özvegy-Laczka C, Wadsack C, Ceckova M. Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110506.
260. Kis O, Zastre JA, Ramaswamy M, Bendayan R. pH dependence of organic anion-transporting polypeptide 2B1 in Caco-2 cells: potential role in antiretroviral drug oral bioavailability and drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(3):1009-22.
261. Kiser JJ, Gerber JG, Predhomme JA, Wolfe P, Flynn DM, Hoody DW. Drug/Drug interaction between lopinavir/ritonavir and rosuvastatin in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;47(5):570-8.
262. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):693-705.
263. Rocha KCE, Pereira BMV, Rodrigues AC. An update on efflux and uptake transporters as determinants of statin response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14(6):613-24.
264. Fan Z, Chen L, Li J, Cheng X, Yang J, Tian C, Zhang Y, Huang S, Liu Z, Cheng J. Clinical Features of COVID-19-Related Liver Functional Abnormality. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(7):1561-6.

265. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, Li Z, Zhou G, Gou J, Qu J, Sun Y, Liu Y, He Q, Chen J, Liu L, Xu L. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol.* 2020;73(3):566-74.
266. Kirby BJ, Collier AC, Kharasch ED, Dixit V, Desai P, Whittington D, Thummel KE, Unadkat JD. Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 2: in vivo induction and in vitro to in vivo correlation of induction of cytochrome P450 1A2, 2B6, and 2C9 by ritonavir or nelfinavir. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(12):2329-37.
267. Marzolini C, Gibbons S, Khoo S, Back D. Cobicistat versus ritonavir boosting and differences in the drug-drug interaction profiles with co-medications. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1755-8.
268. Yang K, Köck K, Sedykh A, Tropsha A, Brouwer KL. An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):3037-57.
269. Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen WS, Schuetz JD, Boyer JL. Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol.* 2004;40(4):585-91.
270. Donner MG, Keppler D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology.* 2001;34(2):351-9.
271. Treiber A, Schneiter R, Häusler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(8):1400-7.
272. Minematsu T, Giacomini KM. Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(3):531-9.
273. Liang X, Giacomini KM. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2245-50.
274. Santoro MG, Carafoli E. Remdesivir: From Ebola to COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;538:145-50.

275. Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch.* 2007;453(5):621-41.
276. Corcione S, De Nicolò A, Montrucchio G, Scabini S, Avataneo V, Bonetto C, Mornese Pinna S, Cusato J, Canta F, Urbino R, Di Perri G, Brazzi L, De Rosa FG, D'Avolio A. Real-life study on the pharmacokinetic of remdesivir in ICU patients admitted for severe COVID-19 pneumonia. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(12):4861-7.
277. Nies AT, König J, Hofmann U, Kölz C, Fromm MF, Schwab M. Interaction of Remdesivir with Clinically Relevant Hepatic Drug Uptake Transporters. *Pharmaceutics.* 2021;13(3).
278. Wen J, Luo J, Huang W, Tang J, Zhou H, Zhang W. The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug-Resistant Protein 4. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;354(3):358-75.
279. Rius M, Keller D, Brom M, Hummel-Eisenbeiss J, Lyko F, Keppler D. Vectorial transport of nucleoside analogs from the apical to the basolateral membrane in double-transfected cells expressing the human concentrative nucleoside transporter hCNT3 and the export pump ABCC4. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(7):1054-63.
280. Kanamitsu K, Kusuhara H, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Investigation of the Importance of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (Mrp4/Abcc4) in the Active Efflux of Anionic Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2566-75.
281. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:125-33.
282. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(4):200-7.
283. de Waart DR, van de Wetering K, Kunne C, Duijst S, Paulusma CC, Oude Elferink RP. Oral availability of cefadroxil depends on ABCC3 and ABCC4. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(3):515-21.
284. Kiser JJ, Carten ML, Aquilante CL, Anderson PL, Wolfe P, King TM, Delahunty T, Bushman LR, Fletcher CV. The effect of lopinavir/ritonavir on the renal clearance of tenofovir in HIV-infected patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):265-72.

285. Becerra E, Aguilera-Durán G, Berumen L, Romo-Mancillas A, García-Alcocer G. Study of Endogen Substrates, Drug Substrates and Inhibitors Binding Conformations on MRP4 and Its Variants by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Molecules*. 2021;26(4).
286. Delgado A, Stewart S, Urroz M, Rodríguez A, Borobia AM, Akatbach-Bousaid I, González-Muñoz M, Ramírez E. Characterisation of Drug-Induced Liver Injury in Patients with COVID-19 Detected by a Proactive Pharmacovigilance Program from Laboratory Signals. *J Clin Med*. 2021;10(19).
287. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, Fu S, Gao L, Cheng Z, Lu Q, Hu Y, Luo G, Wang K, Lu Y, Li H, Wang S, Ruan S, Yang C, Mei C, Wang Y, Ding D, Wu F, Tang X, Ye X, Ye Y, Liu B, Yang J, Yin W, Wang A, Fan G, Zhou F, Liu Z, Gu X, Xu J, Shang L, Zhang Y, Cao L, Guo T, Wan Y, Qin H, Jiang Y, Jaki T, Hayden FG, Horby PW, Cao B, Wang C. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2020;395(10236):1569-78.
288. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, Marks KM, Bruno R, Montejano R, Spinner CD, Galli M, Ahn MY, Nahass RG, Chen YS, SenGupta D, Hyland RH, Osinusi AO, Cao H, Blair C, Wei X, Gaggar A, Brainard DM, Towner WJ, Muñoz J, Mullane KM, Marty FM, Tashima KT, Diaz G, Subramanian A. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(19):1827-37.
289. Leegwater E, Strik A, Wilms EB, Bosma LBE, Burger DM, Ottens TH, van Nieuwkoop C. Drug-induced Liver Injury in a Patient With Coronavirus Disease 2019: Potential Interaction of Remdesivir With P-Glycoprotein Inhibitors. *Clin Infect Dis*. 2021;72(7):1256-8.
290. Fontana RJ, Hayashi PH, Gu J, Reddy KR, Barnhart H, Watkins PB, Serrano J, Lee WM, Chalasani N, Stolz A, Davern T, Talwakar JA. Idiosyncratic drug-induced liver injury is associated with substantial morbidity and mortality within 6 months from onset. *Gastroenterology*. 2014;147(1):96-108.e4.
291. Watkins PB. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(6):788-90.

292. Sundaram SS, Sokol RJ. The Multiple Facets of ABCB4 (MDR3) Deficiency. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2007;10(6):495-503.
293. Tupova L, Ceckova M, Ambrus C, Sorf A, Ptackova Z, Gaborik Z, Staud F. Interactions between Maraviroc and the ABCB1, ABCG2, and ABCC2 Transporters: An Important Role in Transplacental Pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(9):954-60.
294. Wang H, Wang W, Gong B, Wang Z, Feng Y, Zhang W, Wang S, Peng Y, Zheng J. Glutathione Conjugation and Protein Adduction Derived from Oxidative Debromination of Benzbromarone in Mice. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(11):1281-90.
295. Katoh M, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory potencies of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists to P-glycoprotein-mediated transport: comparison with the effects on CYP3A4. *Pharm Res.* 2000;17(10):1189-97.
296. Li L, Jiang W, Wang J. Clinical analysis of 275 cases of acute drug-induced liver disease. *Front Med China.* 2007;1(1):58-61.
297. Li Y, Revalde J, Paxton JW. The effects of dietary and herbal phytochemicals on drug transporters. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;116:45-62.
298. Bohn T, McDougall GJ, Alegría A, Alminger M, Arrigoni E, Aura AM, Brito C, Cilla A, El SN, Karakaya S, Martínez-Cuesta MC, Santos CN. Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(7):1307-23.
299. Babos MB, Heinan M, Redmond L, Moiz F, Souza-Peres JV, Samuels V, Masimukku T, Hamilton D, Khalid M, Herscu P. Herb-Drug Interactions: Worlds Intersect with the Patient at the Center. *Medicines (Basel).* 2021;8(8).
300. Ziemann J, Lendeckel A, Müller S, Horneber M, Ritter CA. Herb-drug interactions: a novel algorithm-assisted information system for pharmacokinetic drug interactions with herbal supplements in cancer treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019;75(9):1237-48.
301. Hu Q, Zhang W, Wu Z, Tian X, Xiang J, Li L, Li Z, Peng X, Wei S, Ma X, Zhao Y. Baicalin and the liver-gut system: Pharmacological bases explaining its therapeutic effects. *Pharmacol Res.* 2021;165:105444.

302. Zhang Y, Lyu C, Fong SYK, Wang Q, Li C, Ho NJ, Chan KS, Yan X, Zuo Z. Evaluation of potential herb-drug interactions between oseltamivir and commonly used anti-influenza Chinese medicinal herbs. *J Ethnopharmacol.* 2019;243:112097.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Temesszentandrási-Ambrus C, Tóth S, Verma R, Bánhegyi P, Szabadkai I, Baska F, Szántai-Kis C, Hartkoorn RC, Lingerfelt MA, Sarkadi B, Szakács G, Örfi L, Nagaraja V, Ekins S, Telbisz Á. Characterization of new, efficient Mycobacterium tuberculosis topoisomerase-I inhibitors and their interaction with human ABC multidrug transporters. PLoS One. 2018 Sep 5;13(9):e0202749

Telbisz Á, **Ambrus C**, Mózner O, Szabó E, Várady G, Bakos É, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C. Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. Pharmaceutics. 2021 Jan 9;13(1):81.

Ambrus C, Bakos É, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C, Telbisz Á. Interactions of anti-COVID-19 drug candidates with hepatic transporters may cause liver toxicity and affect pharmacokinetics. Sci Rep. 2021 Sep 8;11(1):17810.

Temesszentandrási-Ambrus Csilla, Nagy Gábor, Bui Annamária, Gáborik Zsuzsanna A Unique In Vitro Assay to Investigate ABCB4 Transport Function International Journal of Molecular Sciences 24: 5 Paper:4459, 15 p. (2023)

Kalapos-Kovács B, Juhász V, **Temesszentandrási-Ambrus C**, Magda B, Szabó PT, Antal I, Klebovich I, Krajcsi P. Baicalin is a substrate of OATP2B1 and OATP1B3. Phytother Res. 2018 Aug;32(8):1647-1650.

11.2. Disszertációtól független közlemények

Majai G, Gogolák P, **Ambrus C**, Vereb G, Hodrea J, Fésüs L, Rajnavölgyi E. PPAR γ modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils. J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):981-91.

Jani M, **Ambrus C**, Magnan R, Jakab KT, Beéry E, Zolnerciks JK, Krajcsi P. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. Arch Toxicol. 2014 Jun;88(6):1205-48.

Erdő F, **Temesszentandrás-Ambrus C**, Beéry E. Role of drug transporters in the central nervous system. Orv Hetil. 2016 Mar 6;157(10):370-8.

Tupova Lenka, Ceckova Martina, **Ambrus Csilla**, Sorf Ales, Ptackova Zuzana, Gaborik Zsuzsanna, Staud Frantisek Interactions between Maraviroc and the ABCB1, ABCG2, and ABCC2 Transporters: An Important Role in Transplacental Pharmacokinetics Drug metabolism and Disposition 47: 9 pp. 954-960. (2019)

Naseem Afia, Pal Akos, Gowan Sharon, Asad Yasmin, Donovan Adam, **Temesszentandrasi-Ambrus Csilla**, Kis Emese, Gaborik Zsuzsanna, Bhalay Gurdip, Raynaud Florence Intracellular Metabolomics Identifies Efflux Transporter Inhibitors in a Routine Caco-2 Cell Permeability Assay-Biological Implications CELLS 11: 20 Paper: 3286,20 p. (2022)

Lazzaro Sarah, West Mark A, Eatemadpour Soraya, Feng Bo, Varma Manthena VS, Rodrigues A David, **Temesszentandrás-Ambrus Csilla**, Kovács-Hajdu Péter, Nerada Zsuzsanna, Gáborik Zsuzsanna, Costales Chester Translatability of In Vitro Inhibition Potency to In Vivo P-Glycoprotein Mediated Drug Interaction Risk Journal of Pharmaceutical Sciences Paper: DOI: 10.1016/j.xphs.2023.01.014, 9 p. (2023)

12. Köszönetnyilvánítás

Legnagyobb köszönettel és hálával témavezetőmnek, Dr. Sarkadi Balázs Professor Úrnak tartozom. Nemcsak a kitüntető bizalmat, a sok segítséget köszönöm, hanem azt a lehetőséget is, hogy iránymutatásával rengeteget tanulhattam az évek során.

Külön szeretném megköszönni Dr. Telbisz Ágnesnek -akinek szintén elvülhetetlen érdemei vannak ennek a disszertációnak a megszületésében- a folyamatos figyelmességet, tanácsait. Köszönet illeti meg a kutatásban résztvevő Természettudományi Kutatóban dolgozó kollégáimat is. A disszertáció alapját adó egyes eredmények Dr. Bakos Éva, Mózner Orsolya, Dr. Özvegy-Laczka Csilla, Dr. Szabó Edit és Dr. Várady György munkája nélkül nem valósulhattak volna meg.

Kiemelten köszönöm Dr. Gáborik Zsuzsannának, főnökömnek, a SOLVO Biotechnológiai ZRt. kutatás-fejlesztési vezetőjének biztató személyes támogatását, készséges segítségét, a közös gondolkodást.

Kiemelten köszönöm továbbá Dr. Kis Emesének, Dr. Krajcsi Péternek és ifj. Duda Ernőnek folyamatos támogatásukat, s hogy munkám mellett lehetővé tették részvételemet a doktori képzésben.

Köszönettel adózom Kollégáim előtt, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ez a disszertáció megszülethessen.

Külön köszönöm Dr. Rajnavölgyi Éva Professor Asszonynak és Orosz-Tóth Katalinnak, akik mellett egyetemi hallgatóként, majd doktoranduszként is tanulhattam, hasznos, életre szóló iránymutatásaikat.

Végül, de nem utolsó sorban azoknak mondok köszönetet, akik segítsége, támogatása hozzájárult ahhoz, hogy doktori tanulmányaimat befejeztem és disszertációmát megírtam. Különösképpen barátnőmnek, Dr. Beéry Erzsébetnek köszönöm a folytonos „noszogatást” a doktori kutatás lefolytatásához.

Szüleimnek végtelen hálával tartozom és köszönöm, hogy idejükkal, türelmükkal, segítőkészségükkal, szeretetükkal támogattak.

A legnagyobb köszönet a családomat illeti. Férjem, Dr. Temesszentandrás György többször átsegített a nehéz időszakokon. Nagy türelemmel és sok szeretettel, szurkolással állták

gyermekeim, Anna és György, hogy sokszor a „PhD ügyek” nyertek a velük töltött minőségi idővel szemben. Nem lehetek elég hálás nekik.

Köszönöm! Éljenek a vidrák!

RESEARCH ARTICLE

Characterization of new, efficient *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase-I inhibitors and their interaction with human ABC multidrug transporters

Csilla Temesszentandrás-Ambrus^{1,2}, Szilárd Tóth¹, Rinkee Verma³, Péter Bánhegyi⁴, István Szabadkai⁴, Ferenc Baska⁴, Csaba Szántai-Kis⁴, Ruben C. Hartkoorn⁵, Mary A. Lingerfelt⁶, Balázs Sarkadi¹, Gergely Szakács¹, László Órfi^{4,7}, Valakunja Nagaraja³, Sean Ekins⁶, Ágnes Telbisz^{1*}

1 Institute of Enzymology, RCNS-HAS, Budapest, Hungary, **2** Molecular Medicine Doctoral School, Semmelweis University, Budapest, Hungary, **3** Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore, India, **4** Vichem Chemie Research Ltd., Budapest, Hungary, **5** Chemical Biology of Antibiotics, Center for Infection and Immunity, Inserm, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, Lille, France, **6** Collaborations Pharmaceuticals, Inc., Raleigh, United States of America, **7** Department of Pharmaceutical Chemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary

* telbisz.agnes@tk.mta.hu



OPEN ACCESS

Citation: Temesszentandrás-Ambrus C, Tóth S, Verma R, Bánhegyi P, Szabadkai I, Baska F, et al. (2018) Characterization of new, efficient *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase-I inhibitors and their interaction with human ABC multidrug transporters. PLoS ONE 13(9): e0202749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749>

Editor: Irina V. Lebedeva, Columbia University, UNITED STATES

Received: February 16, 2018

Accepted: August 8, 2018

Published: September 5, 2018

Copyright: © 2018 Temesszentandrás-Ambrus et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Additional data will be available at [10.5281/zenodo.1290791](https://doi.org/10.5281/zenodo.1290791).

Funding: This research was funded by DST TÉT_13_DST-1-2013-0012 by the Department of Science and Technology, Government of India and the NKFIH (National Research Development and

Abstract

Drug resistant tuberculosis (TB) is a major worldwide health problem. In addition to the bacterial mechanisms, human drug transporters limiting the cellular accumulation and the pharmacological disposition of drugs also influence the efficacy of treatment. *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase-I (MtTopo-I) is a promising target for antimicrobial treatment. In our previous work we have identified several hit compounds targeting the MtTopo-I by *in silico* docking. Here we expand the scope of the compounds around three scaffolds associated with potent MtTopo-I inhibition. In addition to measuring the effect of newly generated compounds on MtTopo-I activity, we characterized the compounds' antimicrobial activity, toxicity in human cells, and interactions with human multidrug transporters. Some of the newly developed MtTopo-I inhibitors have strong antimicrobial activity and do not harm mammalian cells. Moreover, our studies revealed significant human ABC drug transporter interactions for several MtTopo-I compounds that may modify their ADME-Tox parameters and cellular effects. Promising new drug candidates may be selected based on these studies for further anti-TB drug development.

Introduction

Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) are becoming a major worldwide health problem. According to the WHO database (2017), 490,000 drug resistant TB cases were identified in 2016, and an additional 110,000 cases were reported to be susceptible to isoniazid but resistant to rifampicin (RR-TB). By the

Innovation Office) Hungary, KFI_16-1-2017-0232 by NKFIH (National Research Development and Innovation Office) Hungary, and More Medicines For Tuberculosis (MM4TB), grant agreement no. 260872 by the European Community Seventh Framework Programme 7. All fundings supported experimental research aiming to find new antitubercular compounds. Grants supported collaborative works of authors SE, RH, VN and LÓ in MM4TB, VN, LÓ, BS, GSZ in DST-TÉT funding, and AT in KFI_16-1-2017-0232. The funders (DST Government of India, NKFIH, European Community Seventh Framework Programme 7) provided supports in the form of research materials and salaries for AT. Vichem Chemie Research Ltd provided funding in the form of salaries for PB, IS, FB, CSSZ, and LO. Collaborations Pharmaceuticals Inc provided funding in the form of a salary for SE, ML. The specific roles of these authors are articulated in the "Author Contributions" section. The funders did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Authors PB, IS, FB, CSSZ, and LO are employed by Vichem Chemie Research Ltd. SE and ML are employed by Collaborations Pharmaceuticals Inc. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Abbreviations: ADME-Tox, Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity; ABC transporter, ATP Binding Cassette Transporter; DCV, Dye cyclor violet; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; MDR, multidrug resistance; MtTopo-I, topoisomerase I of *Mycobacterium tuberculosis*; TB, Tuberculosis.

end of 2016, the average proportion of MDR-TB cases, together with XDR-TB was 6.2%. In the less developed African and Asian areas the observed number of drug resistant cases is especially high. Co-morbidity of TB with other diseases, including HIV-AIDS is widely observed, and inadequate antibiotic treatment has also been shown to contribute to TB drug resistance in patients.

In addition to bacterial factors related to mutations or metabolic adaptation, antitubercular drug resistance is also shaped by host cell factors [1–3]. Human multidrug transporters of the ATP binding cassette (ABC) superfamily protect the organism against xenobiotics and influence the passage of drugs through the cell membranes and tissue barriers. Several antitubercular agents, including fluoroquinolones and aminoglycosides were shown to be substrates, inhibitors, or inducers of the two prominent human MDR transporters, ABCB1 and ABCG2 [1, 4–8]. These transporters were shown to play a major role in TB resistance, especially in cases when the drug treatment is prolonged [9]. MDR transporters are also present in the surface membrane of alveolar macrophages, shielding surviving *Mycobacterium tuberculosis* bacteria [10–12]. For these reasons, investigating ABC transporter interactions in the early stage of anti-TB drug development is indispensable.

To overcome bacterial resistance in tuberculosis, specific mycobacterial targets have been investigated, among them type-I DNA topoisomerases that catalyze the relaxation of negatively supercoiled DNA. As opposed to other types of microorganisms, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) has a single topoisomerase-I enzyme (MtTopo-I) [13–15]. According to transposon-based knock-down experiments, MtTopo-I is essential [16], and specific inhibitors of this enzyme are considered to be antitubercular drugs. Our previous work has shown that MtTopo-I has unique properties and a targeted inhibitor development may result in specific inhibitors [17]. The compounds investigated in our studies were synthesized by Vichem Chemie Research Ltd. and are part of a proprietary collection of designed compounds. As a proof of concept, we screened Vichem's compound library (639 compounds) and identified 108 compounds that bind to specific sites of MtTopo-I [18, 19]. Recently, the homology model and the crystal structure of MtTopo-I has been published, opening the way for rational design of inhibitors [17, 20–24]. From among the positive hits with benzo(g)-quinoxaline, quinoxaline or styryl-benzo(g)-quinazoline scaffolds, in the present work we selected 7 compounds for further characterization. All these compounds showed significant MtTopo-I inhibitory potential. Since the interaction of antitubercular compounds with human MDR transporters may influence general ADME-Tox properties as well as cellular drug resistance, in addition to direct MtTopo-I inhibition and bacterial growth inhibition studies we also investigated the effect of these compounds on the activity of human ABCB1 and ABCG2. We suggest that compounds exhibiting significant Mtopo-I inhibition without mammalian cell toxicity and showing an advantageous ABC transporter interaction pattern may represent new possibilities for further anti-TB drug development.

Materials and methods

Materials were purchased from Sigma-Aldrich or Thermo-Fisher Scientific (Calcein-AM, DCV, Presto-blue reagent).

Vichem's compound library

The Vichem Library compounds (Fig 1) were synthesized by Vichem Chemie Research Ltd. and are part of a proprietary collection [25], (<https://vichemchemie.com/nested-chemical-library-ncl/>). Several Vichem Library compounds were tested previously for their MtTopo-I inhibitory potential [18], and in this paper a selected set was further characterized. The

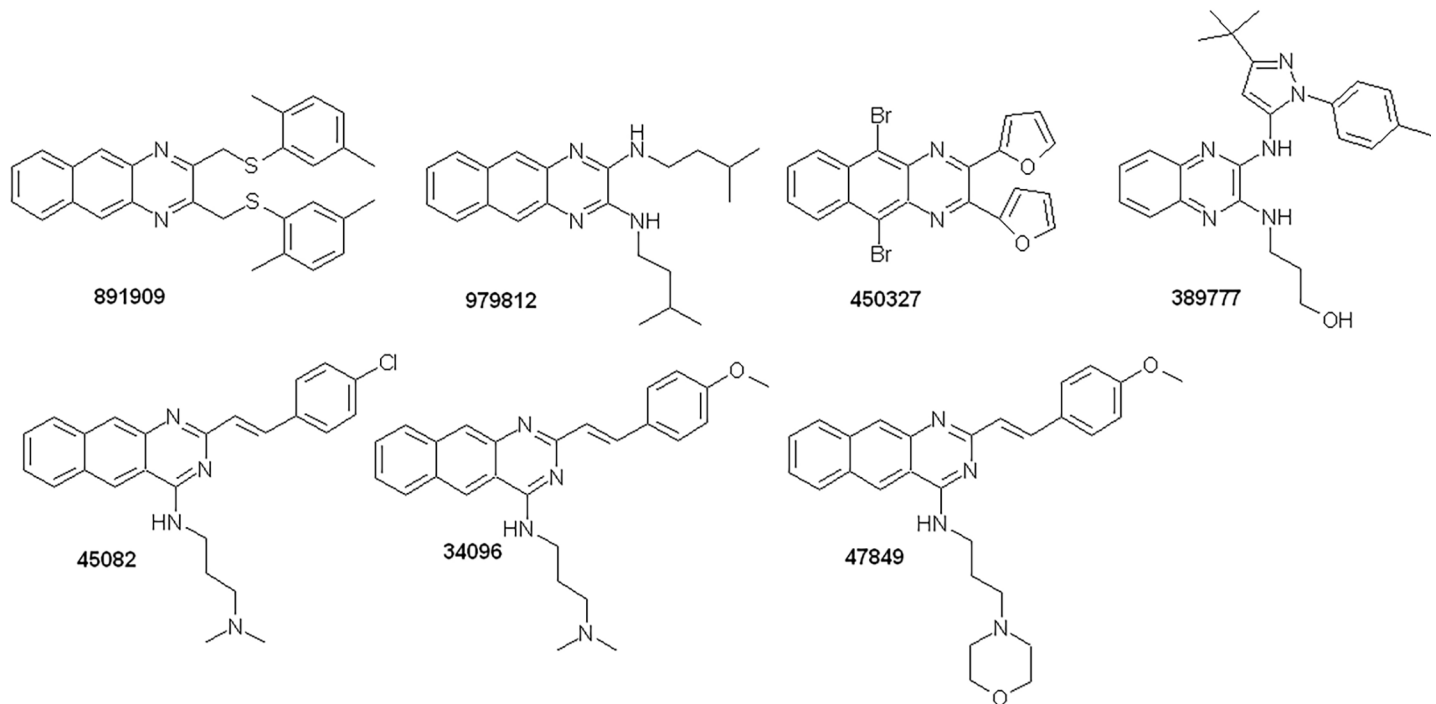


Fig 1. Chemical structures of the Vichem's MtTopo-I inhibitors.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.g001>

chemical structures of the selected compounds are presented in Fig 1, showing the benzo(g)-quinoxaline, quinoxaline or styryl-benzo(g)-quinazoline scaffolds. The synthesis of these compounds has been described in the Supplementary Information (S1 Fig).

***In silico* docking studies**

Docking studies were performed with the MtTopo-I structure, based on the published crystal structure (PDB ID: 5D5H), and a previous homology model, using Discovery Studio, version 4.1 (Biovia, San Diego, CA), as described previously [18]. Possible binding conformations and binding site interactions with MtTopo-I were characterized using the Schrödinger module, Induced Fit protocol, (Schrödinger Inc. Portland, OR), in which the Glide and Prime stages of searching best fit to structure had the following parameters: for the first Glide calculation, receptor and ligand Van der Waals radii were set at a default value of 50% and the maximum number of poses to report was set at 20. During the Prime stage of the calculation, residues within 5.0 Å of the ligand were refined to better accommodate the ligand. Actual docking of the ligand in the protein was performed by the Glide module in the second step of the algorithm. The top 20 poses produced by the first calculation were re-docked in the protein. Docked poses that were within 30.0 kcal/mol of the absolute lowest (relative) pose were then reconsidered, and the best two of each were kept. Box Center was chosen as centroid of residues: 48, 51, 113, 114, 115, 164, 167, 168, 171, 342, 344, 345, 346, 347, 382, 383, 384, 387, 388, 533, 534, 535, 536, and 591 [18]. (S2 Fig)

DNA relaxation assay

The DNA relaxation assay of supercoiled pUC18 DNA by MtTopo-I enzyme was carried out as described previously [17, 18]. Briefly, the MtTopo-I enzyme was expressed and purified from *E. coli* as described in [17]. Purification of MtTopo-I enzyme was examined by

SDS-PAGE. In DNA relaxation assay one unit of MtTopo-I was preincubated at 37°C for 15 min with increasing concentrations of investigated compounds from Vichem's compound library, in a reaction buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1 mM EDTA). In each experiment, besides the negative and solvent control, a previously established MtTopo-I inhibitor, norclomipramine, was used as positive control [21]. After preincubation, 500 ng substrate DNA was added and incubated with the enzyme at 37°C for 30 min. The samples were electrophoresed in 1.2% agarose gel for 12 h at 2.5 V/cm, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), and the DNA bands were visualized using a gel documentation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The effects of compounds were tested first at 100 µM, in the next round positive hits were investigated at 50, 10, 1 and 0.1 µM concentrations. After that, further concentrations were analyzed optionally between the closest non-effective and effective concentrations, to define the concentration of the compound required for complete inhibition (S3 Fig). Assays were repeated for two to three times for each compound.

H37Rv toxicity assay

Selected compounds from the Vichem library (Fig 1) were screened for antimicrobial effects on a replicating strain, H37Rv of *Mycobacterium tuberculosis* (Institute Pasteur, Paris), using resazurin reduction microplate assay (REMA). H37Rv was cultivated in Middlebrook 7H9 supplemented with 10% ADC, 0.2% glycerol and 0.05% Tween 80, at 37°C. For plate assays, starting culture was diluted to 0.0002 at OD600 from a log phase culture. The first screen applied 20 µM of the compounds in a 7 day-long exposure, in 384-well plate format, against replicating H37Rv, as described previously [26]. Molecules that showed more than 80% inhibition of resazurin reduction at 20 µM, were further examined to determine their minimal inhibitory concentration (MIC) by REMA, with serial dilutions of the tested compounds (20 to 0.04 µM, in two times dilution series) on 96-well plates, as described in [26] (S4 Fig). All screening was done with on plate controls (without treatment, solvent control, and rifampicin at 0.1 µg/ml, as a positive control). Plates were read on a Tecan Infinite M200. Rifampicin was always giving a Z-factor greater than 0.7. All compounds were measured at least in two independent experiments.

ATPase activity assay for the human ABC transporters, ABCB1 and ABCG2

The human ABCB1 and ABCG2 proteins were expressed in the baculovirus-Sf9 insect cell system. Baculovirus-infected cells were harvested at 72 hours, and the cell membrane fraction was prepared by mechanical homogenization and differential centrifugation. Human ABC transporter containing membrane vesicles were used in the ATPase activity assay as described earlier [27]. Briefly, the cell membrane vesicle preparation (5 µg membrane protein/sample) was diluted in an assay buffer containing non-ABC ATPase inhibitors, and the activity assay was started by the addition of 3.3 mM MgATP. Reference substrates were used in each assay as indicated in results. The reaction was stopped by adding SDS after incubation for 20 minutes at 37°C. Vanadate-sensitive ATPase activity was calculated based on the quantification of inorganic phosphate, as determined by a colorimetric reaction detected by a VictorX3 plate reader (Perkin Elmer) at 630 nm [28]. Each compound was measured in at least three independent experiments with three parallels in each case. DMSO, used as solvent of compounds, had no effect in this assay at the applied concentration.

Cellular transport assays for ABCB1 and ABCG2

For cellular transport assays, mammalian PLB (lymphoblastoid) cell lines, overexpressing ABCB1 or ABCG2 were used. The parental PLB cell line was purchased from ATCC, and

ABCB1 or ABCG2 overexpressing cell lines were established by using lentiviral vectors for human ABC transporters as described earlier in [29]. The transport assays were carried out in 96-well plates. 1×10^5 cells were incubated in the presence of 0.1 μM Calcein-AM or 1 μM DCV (Dye Cycler Violet) for the ABCB1 and for the ABCG2 assays, respectively [30, 31]. The assay was performed in HPMI medium (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 0.4 mM, CaCl_2 0.04 mM, HEPES 10 mM, NaHCO_3 10 mM, glucose 10 mM, Na_2HPO_4 5 mM; pH 7.4). Fluorescence of the cells was detected using a Victor X3 plate reader (for Calcein, exc. at 485 nm, em. at 535 nm) or the Enspire 2300 (Perkin Elmer) plate reader (for DCV, exc. at 360 nm, em. at 440 nm). Kinetics of fluorescence intensity changes were analyzed to determine relative inhibition, compared to that of a reference agent, providing full inhibition of the ABC transporter. Two of the Vichem compounds examined (VCC979812 and VCC38977) were not compatible with the DCV uptake assay because of their intrinsic fluorescence, therefore for these two compounds ABCG2 transport inhibition was characterized by following mitoxantrone uptake. Mitoxantrone uptake was measured by flow cytometry (BD FACSCanto at 633 nm) by 20 minutes incubation in the presence of 7.5 μM mitoxantrone. Each compound was measured in at least three independent experiments with three parallels in each case. DMSO, used as a solvent of compounds had no effect in this assay at the applied concentration.

Cytotoxicity assays in mammalian cell lines

The toxic effects of the selected MtTopo-I inhibitory Vichem compounds were tested in three cell lines, HFF (human foreskin fibroblast), HEK293 (human embryonic kidney) and A431 (human epidermoid carcinoma) cell lines, obtained from ATCC. Establishment of ABC transporter-expressing A431 cell lines was achieved by retroviral transduction of the cells as described previously [32].

For cytotoxicity measurements the cells were seeded in a 96-well culture plate at 5,000 cells/well (A431, HEK293) or 6000 cells/well (HFF) and incubated overnight. Cells were allowed to attach to the plate for 24 hours and then serially diluted drugs were added at final concentrations ranging from 20 μM to 3 nM, except for the reference compound, irinotecan, which was tested in the range of 60 μM to 9 nM. After 72 hours of incubation viability was assessed by PrestoBlue® assay (Invitrogen). IC_{50} values were obtained by sigmoidal curve fitting in the GraphPad Prism software. All experiments were performed in triplicates and repeated at least in three independent experiments. DMSO, used as solvent of the compounds, had no effect on viability at the applied concentration.

Results

Compound selection

In silico docking studies on MtTopo-I enzyme and MtTopo-I enzyme inhibition assays were performed previously for numerous Vichem Library compounds, while in the current study we characterized a selected set of seven MtTopo-I inhibitor compounds. For the present study we have chosen the most promising *in silico* hits with benzo(g)-quinoxaline, quinoxaline, or styryl-benzo(g)-quinazoline scaffolds. In the current study, by measuring antibacterial effects, non-desirable toxic effects, and interactions with human ABC multidrug transporters, we attempted to generate a focused prescreening system for targeted drug development.

In silico docking of selected compounds into the Mt Topo-I structure

As published previously, binding potentials of several compounds from the Vichem's NCL library and the FDA drug catalogue were examined by *in silico* studies that predicted binding

of compounds to the MtTopo-I enzyme. These studies used a homology model of MtTopo-I, refined by a published crystal structure of MtTopo-I, and potential interaction sites were further characterized by a machine learning method [18, 24]. Several Vichem Library compounds as well as clomipramine (previously identified as an inhibitor of MtTopo-I activity), were docked in the MtTopo-I crystal structure (10.2210/pdb5d5h/pdb) to identify potential interaction sites (S2 Fig).

Representative docking results are shown in the Supplementary material. S2 Fig. shows a part of the protein structure where key interactions were observed with Arg167 and Arg114 in MtTopo-I. In the Schrodinger method, "goodness" of drug binding in the protein structure is characterized by a GlideScore that is an empirical scoring function designed to maximize separation of compounds with strong binding affinity from those with little to no binding ability. Table 1 shows GlideScores for clomipramine and for the Vichem compounds selected for more detailed biochemical characterization. All selected compounds scored reasonably well in docking studies, suggesting binding to the investigated site, and all but two of the Vichem compounds scored more favorably than clomipramine.

Determination of MtTopo-I inhibitory potential

MtTopo-I was expressed and purified from *E. coli* as described previously [17]. The inhibitory effect of compounds from Vichem NCL Library on MtTopo-I enzyme activity was investigated by *in vitro* DNA relaxation assays. Norclomipramine, a previously established MtTopo-I inhibitor, was used as a positive control [21]. Concentrations required for complete inhibition of the MtTopo-I activity was determined by applying a gradually refined concentration set for a large number of compounds (Table 2, S3 Fig). Here we present data for the selected set of Vichem's compounds (Table 2). Although the MtTopo-I inhibitory potential of the selected compounds was somewhat different, all compounds completely inhibited MtTopo-I activity below 20 μ M. The most potent inhibitor of this selection was VCC450327, showing complete inhibition at 0.1 μ M.

Antituberculous potential of selected compounds assessed in H37Rv growth assay

Antimicrobial potential of Vichem's topoisomerase inhibitor compounds was tested in a growth inhibition assay of the virulent H37Rv mycobacterial strain, first at 20 μ M concentrations. Growth of the H37Rv strain was monitored over a period of seven days. Four

Table 1. Docking score results for selected Vichem Library compounds.

Identifier	Docking
	Glide Score (kcal/mol)
VCC340963	-5.019
VCC450822	-4.742
VCC979812	-2.901
VCC450327	-2.628
VCC389777	-2.475
VCC891909	-2.241
VCC478498	-1.614
Clomipramine	-2.383

Selected Vichem Library compounds were docked into the 5D5H crystal structure of MtTopo-I in addition to clomipramine, which has been previously identified as an inhibitor.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.t001>

Table 2. Effects of selected compounds from Vichem’s compound library on MtTopoI activity and growth of H37Rv Mtb strain.

Identifier	Complete inhibition of MtTopoI (μM)	MIC90 of compounds in H37Rv growth test (μM)
VCC891909	7.5–10	10.4
VCC979812	10	N.I.
VCC389777	7.5–10	N.I.
VCC450327	0.1	N.I.
VCC450822	10.0	5.1
VCC340963	10–25	2.5
VCC478498	10–25	0.6

*N.I. means—no inhibition was observed up to 20 μM

Inhibition of MtTopo-I was measured by DNA relaxation assays by gradually refining the concentrations required for complete inhibition. Bands of relaxed and supercoiled DNA were visualized on agarose gels (S3 Fig). Minimum concentrations providing complete inhibition are shown in the table. The toxicity of the compounds on the virulent H37Rv Mtb strain was determined by growth inhibition tests. Growth inhibitory potential of the compounds was primarily screened at 20 μM and for the effective compounds the minimum concentration providing 90% growth inhibition (MIC90 value) was determined from dose-response viability curves (20 to 0.04 μM). The dose-response curves are presented in supplementary figures (S4 Fig).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.t002>

compounds inhibited the growth of Mtb bacteria below 20 μM, as shown in Table 2, whereas three compounds in this set, despite structural similarities, were ineffective. The MIC90 values were determined from dose-response curves, ranging from 20 to 0.04 μM concentrations (S4 Fig). The MIC90 of four examined compounds was between 0.6–10 μM (Table 2, S4 Fig), suggesting efficient *in vitro* antibacterial effect.

Interactions of selected compounds with human ABC multidrug transporters

ATPase assay results. As mentioned in the introduction, ABC multidrug transporters have an important role in ADME-Tox parameters of many drugs and the detailed investigation of transporter-drug interactions is required in drug development. ABC transporter–drug interactions can be examined by various assays that show such interactions from different aspects. ATPase activity and drug transport are coupled processes in human ABC transporters, and most interacting drugs influence the ATPase activity in a concentration dependent manner. Measuring the inhibition of the active transport of a fluorescent substrate by a test compound is a more sensitive assay, while does not directly show if the test compound is a competing transported substrate or a non-transported inhibitor. Finally, cellular toxicity can also be modified by the expression of ABC drug transporters, and for assessing transporter-drug interactions viability assays can be performed in transporter expressing cells.

In this study ATPase measurements were performed in isolated Sf9 membrane vesicles prepared from human ABC multidrug transporters expressing cells, containing high levels of the human transporters. In the Sf9 membrane ATPase assay, measuring the vanadate-sensitive ATPase activity of the transporter provides a simple but efficient tool to characterize the effects of various drugs [28, 33]. This ATPase activity often has a complex dose-response curve in the presence of drug substrates, and a considerable basal ATPase activity (without any given drug) also complicates the assessment of drug effects.

As shown in Fig 2, we examined the effects of the selected Vichem compounds by following dose-response curves of ATPase activity. The V_{max} values, less informative for these

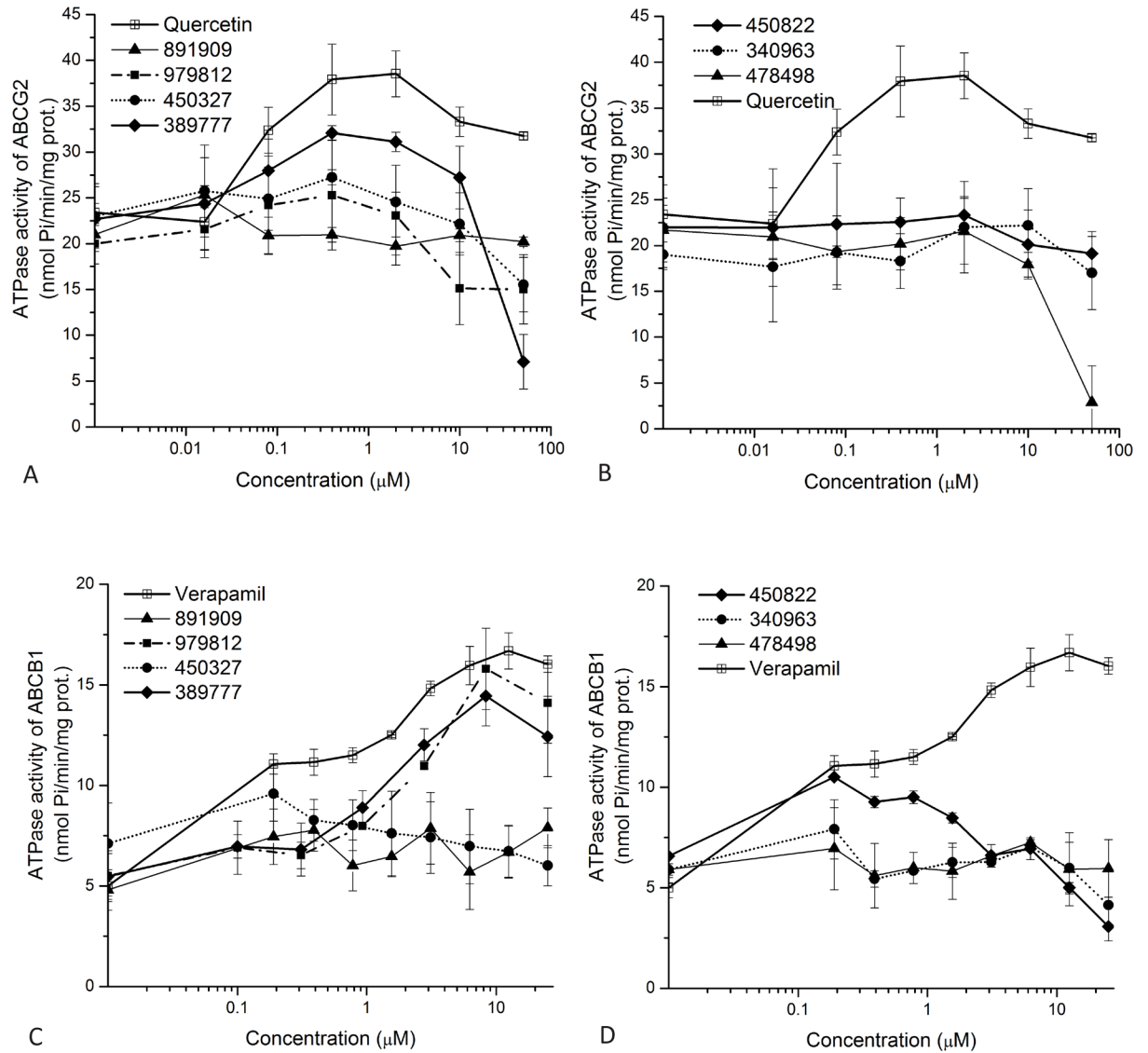


Fig 2. Effects of the Vichem MtTopo-I inhibitors on the ATPase activity of the human ABCG2 and ABCB1 transporters. Purified Sf9 membrane vesicles containing ABCG2 (Upper panels, A and B) or ABCB1 proteins (lower panels, C and D) were used in ATPase assays as described in the Methods section. Vanadate sensitive (ABC transporter related) ATPase activities were measured in the presence of investigated MtTopo-I inhibitors. Compound identity numbers are shown in the Figure. For the sake of visibility, compounds were divided into two groups. At zero compound levels, basal ATPase activity of the ABC transporter, measured without the addition of any drug, is shown. Quercetin (for ABCG2) and verapamil (for ABCB1) were used as reference substrates that are known transported substrates and activate the ATPase activity of the given transporter.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.g002>

interactions, were determined from curves presented in Supplementary file (S5 Fig). We found that VCC389777 significantly stimulated the ABCG2-ATPase activity, while three compounds, VCC389777, VCC979812, and VCC450822 had a well measurable stimulatory effect on the ABCB1-ATPase activity, suggesting the active transport of these compounds. Compound VCC450822 showed a slight stimulation of the ABCB1-ATPase activity at lower concentrations, while strongly inhibited ATPase activity at higher concentrations. This behavior is typical for slowly transported substrates and/or inhibitors of the transporters [33].

Transport assay results. The selected Vichem compounds were further characterized in whole cell transport assays. In these experiments we used transporter-overexpressing human

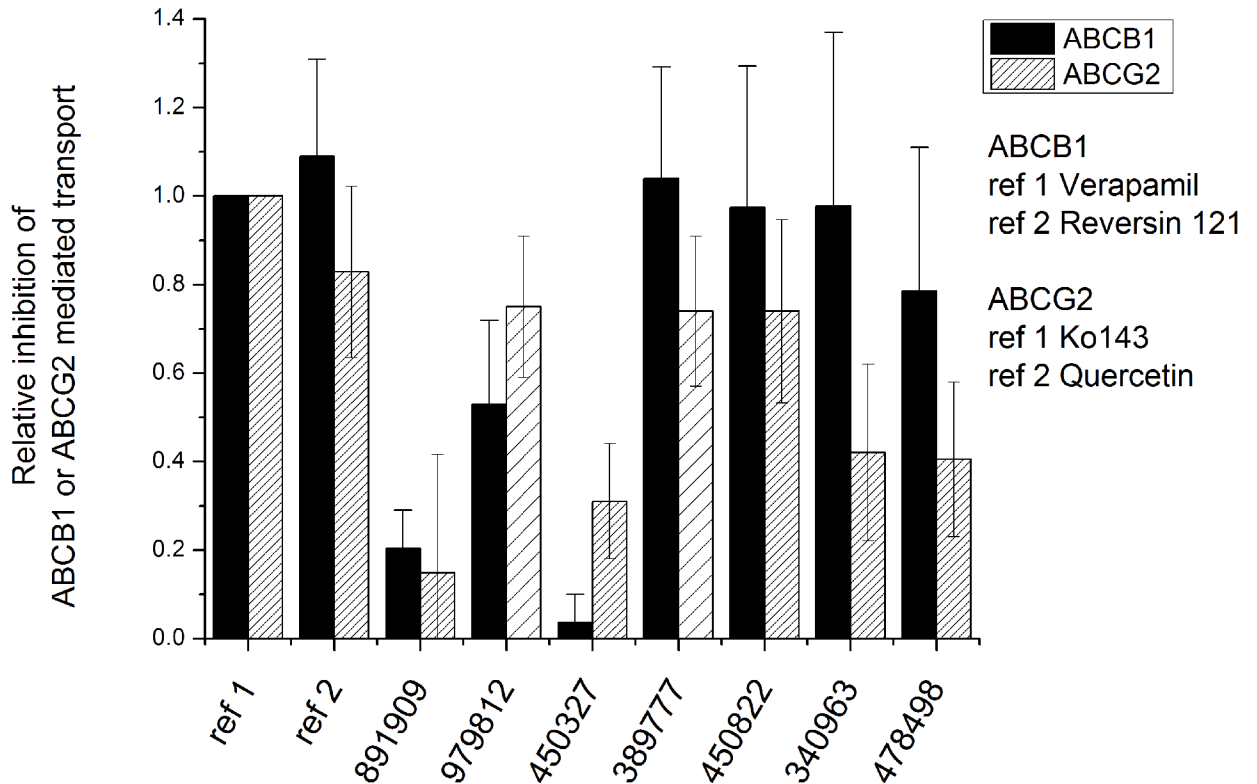


Fig 3. Effects of the Vichem MtTopoI inhibitors on the transport activity of human ABCG2 and ABCB1 transporters. Effects of the compounds on the transport activity of human ABCG2 and ABCB1 proteins were measured in transporter-overexpressing human PLB cells. Accumulation of transporter-specific probe substrates (Calcein-AM for ABCB1 and DCV for ABCG2) was measured in the presence of MtTopo-I inhibitor compounds (5 μ M). The relative inhibitory effects of MtTopo-I inhibitors were determined by using a reference substrate, providing maximum inhibition (20 μ M verapamil or 5 μ M reversin 121 for ABCB1; and 5 μ M Ko143 or 5 μ M quercetin for ABCG2). Compounds VCC979812 and VCC38977 were not compatible with the DCV uptake assay. In these cases (columns with sparse pattern on the figure) ABCG2 transport inhibition was characterized by inhibition of mitoxantrone extrusion, measured after 20 minutes of incubation in the same cell types with the same reference inhibitors. Relative inhibition values higher than 0.2 are statistically significant, based on comparison to control (0) level, by the Student's t-test ($p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.g003>

PLB cells and measured the uptake of various fluorescent substrates of ABCG2 and ABCB1. This type of transport assays is commonly used to explore potential transporter-drug interactions. We found that, except for VCC891909, all the compounds analyzed showed significant interactions with ABCG2 and/or ABCB1 (Fig 3). VCC450327 was found to only moderately influence the ABCG2 mediated transport, while having no effect on ABCB1 mediated transport.

Toxicity of the selected Vichem compounds in human cells

Toxicity was evaluated by using several human cell lines. HFF (human foreskin fibroblast) and HEK293 cells are non-tumor cell lines, whereas A431 cells are derived from a carcinoma. To examine the potential influence of ABC transporters on the human cell toxicity of the investigated compounds, we have also applied ABCB1- and ABCG2-overexpressing A431 cell lines. Irinotecan, a known human topoisomerase inhibitor was used as a reference compound, as this drug is a transported substrate of both ABCG2 and ABCB1 [34].

Table 3 shows that VCC891909 has no toxicity in any of the investigated cell lines, but the other investigated compounds showed variable toxicity. VCC480522, VCC340963 and VCC478498 were toxic (with IC50 values below 5 μ M) in the parental A431 and HFF cells, but

Table 3. Cytotoxicity of the selected MtTopoI inhibitor compounds in human cell lines.

Identifier	Toxicity in HFF cell line cell line, IC ₅₀ (μM)	Toxicity in HEK293 cell line cell line, IC ₅₀ (μM)	Toxicity in parental A431 cell line, IC ₅₀ (μM)	Resistance modulation by ABCB1 (fold increase in IC ₅₀)	Resistance modulation by ABCG2 (fold increase in IC ₅₀)
VCC891909	Non-toxic+	Non-toxic	Non-toxic	NA*	NA
VCC979812	Toxic, 20	Non-toxic	Toxic, 19±2	1.1±0.08	1±0.1
VCC389777	Non-toxic	Non-toxic	Non-toxic	NA	NA
VCC450327	Non-toxic	Non-toxic	Non-toxic	NA	NA
VCC450822	Toxic, 2.5–5	Toxic, 10–20	Toxic, 3.5±0.2	0.97±0.05	1.0±0.03
VCC340963	Toxic, 2.5–5	Toxic, 10–20	Toxic, 3.23±0.4	0.77±0.3	0.9±0.32
VCC478498	Toxic, 2.5–5	Toxic, 10–20	Toxic, 3.03±0.61	0.88±0.06	0.79±0.14
Irinotecan	Non-toxic	Toxic, 2.5	Toxic, 8.6±0.5	2.60±0.01	4.12±0.16

* NA: Not applicable

Cytotoxicity of the compounds was measured in a 72-hours assay in the presence of the indicated compounds. Viability was assessed using the Presto blue® assay. Irinotecan was used as a reference compound. IC₅₀ values presented in the table are determined from dose-response viability curves (not shown). Compounds were tested from 20 μM down to 3 nM. Non-toxic phrase in the table means that the compound is not toxic up to 20 μM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202749.t003>

no difference was observed in the toxicity or the IC₅₀ values between the parental and ABCB1 or ABCG2 expressing A431 cells (Table 3).

Discussion

The increasing number of drug resistant TB cases provides a strong incentive to find new, effective antituberculous agents, potentially avoiding bacterial drug-resistance. Targeting MtTopo-I, an essential and unique mycobacterial DNA repair enzyme offers a promising possibility in this regard [22]. The docking of candidate inhibitor molecules in the recently described crystal structure of MtTopo-I [24] may help to design new antibacterial agents. Since imipramine and clomipramine were shown to be MtTopo-I inhibitors, these molecules served as model drugs for *in silico* docking studies [18]. A compound library of Vichem was screened by such docking studies, and a selected set of compounds was characterized in biological assays [18]. In this paper we show a detailed biological characterization of seven promising topoisomerase inhibitors, selected from Vichem compounds, designed with three different scaffolds.

Optimization of the screening of designed antimycobacterial topoisomerase inhibitor compounds, in addition to the investigation of the antimycobacterial effect, involves steps to find molecules that have limited toxicity in mammalian cells, and a known pattern of human ABC multidrug transporter interactions. Human ABC multidrug efflux transporters are expressed in major tissue barriers and in numerous cell types, including macrophages, thus these transporters significantly modulate ADME-toxicity profiles and cellular effectiveness for a wide variety of drugs [33, 35]. The human ABCG2 and ABCB1 proteins are the key multidrug transporters which have been documented to significantly reduce the cellular uptake and modulate the ADME-Tox parameters of various antibiotics and topoisomerase inhibitors [35]. If a drug candidate is an efficiently transported substrate of these proteins, this generally reduces the oral bioavailability (i.e. intestinal absorption) and the cellular entry of the molecule. In contrast, an inhibitory effect on these drug transporters may facilitate both the absorption and cellular availability of the given compound, as well as that of other, co-administered antimicrobial agents.

In order to explore the direct human cellular toxicity of the selected Vichem compounds, here we used two non-tumor cell lines (HFF and HEK293) and the A431 tumor cell line. A431 is a rapidly growing cell type with known sensitivity to topoisomerase inhibitors. In addition, we also examined drug-resistant derivatives of this cell line to show the potential role of ABCB1 and ABCG2 transporter in toxicity. We found that, although the antimycobacterial effects were promising, some of the Vichem compounds examined here were toxic in at least one of the examined cell line, with IC_{50} values below 5 μ M. Therefore, these compounds probably cannot be considered as promising candidates for *in vivo* human applications.

For further selection of drug candidates, we examined the selected Vichem compounds for ABC transporter interaction in multiple *in vitro* assays (summarized in S6 Fig), aiming for the selection of lead compounds with favorable transporter interaction pattern. In the ATPase activity assay for ABCG2 and ABCB1 transporters, in concentrations of 0.1–10 μ M, several compounds (VCC389777 for ABCG2, and VCC38977, VCC450822, VCC979812 for ABCB1) slightly increased the ATPase activity of either the ABCG2 or ABCB1 protein, indicating that these compounds are likely recognized as transported substrates. In contrast, for ABCG2 in some cases (VCC478498) we obtained only an inhibition of the ATPase activity at high (50 μ M) concentrations, and some of the compounds had no measurable effect on the transporter ATPase activity (VCC891909, VCC340963).

In the direct ABC transporter inhibition assays, providing increased sensitivity but without information about the type of interaction, we found that most of the examined compounds strongly inhibited both ABCG2 and ABCB1 mediated transport of a model compound at concentrations around 5 μ M. VCC891909 had no such transporter inhibitory effect, while VCC450327 had only a slight effect at 5 μ M, and only on the ABCG2 transporter. It is worth mentioning that when we used the drug-resistant, ABCB1 or ABCG2 expressing A431 cell lines, we did not find any significant modulation of the toxicity profiles by these ABC transporters. This finding suggests that the Vichem compounds are slowly transported compounds or rather ABC transporter inhibitors—it should be mentioned that none of these assays clearly distinguish transported substrates and inhibitors, as slowly transported substrates have inhibitory effects at higher concentrations.

Taken together, our data show that VCC979812, VCC450822, VCC340936 and VCC478498 showed interactions with the human ABC transporters, while these compounds were not efficiently extruded by these transporters. VCC891909 had no toxicity in any of the investigated cell lines (HFF, HEK293 and A431). Three other compounds (VCC891909, VCC450327 and VCC389777) were non-toxic in human cells, while may act as direct transporter inhibitors (see S5 Fig).

As a summary, although VCC450822, VCC340963 and VCC478498 effectively inhibited the growth of H37Rv mycobacteria, these compounds were toxic in human cell lines, thus may not be candidates for further human drug development. This toxicity was not significantly affected by the expression of the ABC multidrug transporters. In contrast, VCC891909 showed efficient topoisomerase inhibition, Mtb growth inhibitory effect, and no mammalian cell toxicity without a significant human ABC transporter interaction. Therefore, this compound may be an especially favorable candidate for further antimycobacterial drug development.

Supporting information

S1 Fig. Chemical synthesis scheme of the selected Vichem compounds. The synthetic route of the VCC891909, VCC979812 and VCC450327 is described in WO2002094796 patent (as examples 63, 194 and 369).

(PDF)

S2 Fig. Docking of topoisomerase inhibitors in the crystal structure 5D5H (PDB ID) of Mt Topo-I. 2D structures highlight the key interactions.

(PDF)

S3 Fig. Representative pictures for DNA relaxation assay results presented in Table 2.

(PDF)

S4 Fig. Toxicity of the investigated compounds in H37Rv Mtb strains.

(PDF)

S5 Fig. Effects of the Vichem MtTopo-I inhibitors on the ATPase activity of the human ABCG2 and ABCB1 transporters.

(PDF)

S6 Fig. Summary table for the results of the assays.

(PDF)

Acknowledgments

Technical assistance in these experiments by Tamas Horváth, Lilla Fabi and Evelin Pósa is greatly appreciated. This research was funded by DST TÉT_13_DST-1-2013-0012 by the Department of Science and Technology, Government of India and the NKFIH (National Research Development and Innovation Office) Hungary, KFI_16-1-2017-0232 by NKFIH (National Research Development and Innovation Office) Hungary, and More Medicines For Tuberculosis (MM4TB), grant agreement no. 260872 by the European Community Seventh Framework Programme 7.

This work is dedicated to the memory of late Prof. György Kéri, founder and CEO of Vichem Ltd.

Author Contributions

Conceptualization: Ruben C. Hartkoorn, Balázs Sarkadi, Gergely Szakács, László Örfi, Valakunja Nagaraja, Sean Ekins.

Data curation: Rinkee Verma, Csaba Szántai-Kis, Mary A. Lingerfelt.

Funding acquisition: Balázs Sarkadi, Gergely Szakács, Valakunja Nagaraja.

Investigation: Csilla Temesszentandrás-Ambrus, Szilárd Tóth, Rinkee Verma, Péter Bánhegyi, István Szabadkai, Ferenc Baska, Ruben C. Hartkoorn, Ágnes Telbisz.

Methodology: Szilárd Tóth.

Software: Sean Ekins.

Supervision: Valakunja Nagaraja, Sean Ekins, Ágnes Telbisz.

Visualization: Mary A. Lingerfelt.

Writing – original draft: Csilla Temesszentandrás-Ambrus, Péter Bánhegyi, Ruben C. Hartkoorn, Mary A. Lingerfelt, Ágnes Telbisz.

Writing – review & editing: Balázs Sarkadi, Gergely Szakács.

References

1. Fonseca JD, Knight GM, McHugh TD. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International*




- Society for Infectious Diseases. 2015; 32:94–100. Epub 2015/03/27. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.01.014> PMID: 25809763.
2. Song L, Wu X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *International journal of antimicrobial agents*. 2016; 47(6):421–9. Epub 2016/05/24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.007> PMID: 27211826.
 3. Te Brake LH, Russel FG, van den Heuvel JJ, de Knecht GJ, de Steenwinkel JE, Burger DM, et al. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2016; 96:150–7. Epub 2015/12/20. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.08.004> PMID: 26682943.
 4. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007; 35(10):1873–9. Epub 2007/07/20. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014969> PMID: 17639028.
 5. Brillault J, De Castro WV, Couet W. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(1):543–5. Epub 2009/10/14. <https://doi.org/10.1128/AAC.00733-09> PMID: 19822706; PubMed Central PMCID: PMC2798514.
 6. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, Simmons NL. Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011; 39(12):2321–8. Epub 2011/09/21. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.038323> PMID: 21930826; PubMed Central PMCID: PMC2798514.
 7. Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH, Prieto JG. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006; 34(4):690–5. Epub 2006/01/26. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008219> PMID: 16434544.
 8. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. *Tuberculosis. The New England journal of medicine*. 2013; 368(8):745–55. Epub 2013/02/22. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1200894> PMID: 23425167.
 9. Hartkoorn RC, Chandler B, Owen A, Ward SA, Bertel Squire S, Back DJ, et al. Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2007; 87(3):248–55. Epub 2007/01/30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.12.001> PMID: 17258938.
 10. Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, et al. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *Journal of clinical pathology*. 2002; 55(5):332–9. Epub 2002/05/03. PMID: 11986335; PubMed Central PMCID: PMC2798514.
 11. van der Deen M, de Vries EG, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respiratory research*. 2005; 6:59. Epub 2005/06/22. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-59> PMID: 15967026; PubMed Central PMCID: PMC2798514.
 12. van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, et al. Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 1990; 1(1):56–64. Epub 1990/01/01.
 13. Ahmed W, Menon S, Godbole AA, Karthik PV, Nagaraja V. Conditional silencing of topoisomerase I gene of *Mycobacterium tuberculosis* validates its essentiality for cell survival. *FEMS microbiology letters*. 2014; 353(2):116–23. Epub 2014/03/07. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12412> PMID: 24593153.
 14. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393(6685):537–44. Epub 1998/06/20. <https://doi.org/10.1038/311159> PMID: 9634230.
 15. Ravishankar S, Ambady A, Awasthy D, Mudugal NV, Menasinakai S, Jatheendranath S, et al. Genetic and chemical validation identifies *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I as an attractive anti-tubercular target. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2015; 95(5):589–98. Epub 2015/06/16. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.004> PMID: 26073894.
 16. Guilhot C, Otal I, Van Rompaey I, Martin C, Gicquel B. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *Journal of bacteriology*. 1994; 176(2):535–9. Epub 1994/01/01. PMID: 8288551; PubMed Central PMCID: PMC2798514.
 17. Godbole AA, Leelaram MN, Bhat AG, Jain P, Nagaraja V. Characterization of DNA topoisomerase I from *Mycobacterium tuberculosis*: DNA cleavage and religation properties and inhibition of its activity.

- Archives of biochemistry and biophysics. 2012; 528(2):197–203. Epub 2012/10/23. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.10.004> PMID: 23085346.
18. Ekins S, Godbole AA, Keri G, Orfi L, Pato J, Bhat RS, et al. Machine learning and docking models for *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2017; 103:52–60. Epub 2017/02/27. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.01.005> PMID: 28237034.
 19. Sipos A, Pató J, Székely R, Hartkoorn RC, Kékesi L, Órfi L, et al. Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library. *Tuberculosis*. 2015; 95:S200–S6. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.028> PMID: 25801335
 20. Chaudhari K, Surana S, Jain P, Patel HM. *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) GyrB inhibitors: An attractive approach for developing novel drugs against TB. *European journal of medicinal chemistry*. 2016; 124:160–85. Epub 2016/08/30. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.034> PMID: 27569197.
 21. Godbole AA, Ahmed W, Bhat RS, Bradley EK, Ekins S, Nagaraja V. Targeting *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I by small-molecule inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015; 59(3):1549–57. Epub 2014/12/24. <https://doi.org/10.1128/AAC.04516-14> PMID: 25534741; PubMed Central PMCID: PMC4325804.
 22. Nagaraja V, Godbole AA, Henderson SR, Maxwell A. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy. *Drug discovery today*. 2017; 22(3):510–8. Epub 2016/11/20. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.006> PMID: 27856347.
 23. Sandhaus S, Annamalai T, Welmaker G, Houghten RA, Paz C, Garcia PK, et al. Small-Molecule Inhibitors Targeting Topoisomerase I as Novel Antituberculosis Agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(7):4028–36. Epub 2016/04/27. <https://doi.org/10.1128/AAC.00288-16> PMID: 27114277; PubMed Central PMCID: PMCPmc4914652.
 24. Tan K, Cao N, Cheng B, Joachimiak A, Tse-Dinh YC. Insights from the Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Topoisomerase I with a Novel Protein Fold. *Journal of molecular biology*. 2016; 428(1):182–93. Epub 2015/12/15. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.024> PMID: 26655023; PubMed Central PMCID: PMCPmc4738035.
 25. Keri G, Szekelyhidi Z, Banhegyi P, Varga Z, Hegymegi-Barakonyi B, Szantai-Kis C, et al. Drug discovery in the kinase inhibitory field using the Nested Chemical Library technology. *Assay and drug development technologies*. 2005; 3(5):543–51. Epub 2005/11/25. <https://doi.org/10.1089/adt.2005.3.543> PMID: 16305311.
 26. Sala C, Dhar N, Hartkoorn RC, Zhang M, Ha YH, Schneider P, et al. Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(10):4150–8. Epub 2010/08/04. <https://doi.org/10.1128/AAC.00821-10> PMID: 20679505; PubMed Central PMCID: PMC2944619.
 27. Telbisz A, Muller M, Ozvegy-Laczka C, Homolya L, Sente L, Varadi A, et al. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2007; 1768(11):2698–713. ISI:000251493700006.
 28. Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *The Journal of biological chemistry*. 1992; 267(7):4854–8. PMID: 1347044.
 29. Ujhelly O, Ozvegy C, Varady G, Cervenak J, Homolya L, Grez M, et al. Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Human gene therapy*. 2003; 14(4):403–12. Epub 2003/03/28. <https://doi.org/10.1089/104303403321209005> PMID: 12659681.
 30. Nerada Z, Hegyi Z, Szepesi A, Toth S, Hegedus C, Varady G, et al. Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2016. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22931> PMID: 27602881.
 31. Homolya L, Hollo M, Muller M, Mechetner EB, Sarkadi B. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer*. 1996; 73(7):849–55. PMID: 8611394.
 32. Elkind NB, Szentpetery Z, Apati A, Ozvegy-Laczka C, Varady G, Ujhelly O, et al. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res*. 2005; 65(5):1770–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3303> PMID: 15753373.
 33. Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug discovery today*. 2008; 13(9–10):379–93. Epub 2008/05/13. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010> PMID: 18468555.
 34. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2006; 20(2):163–75. Epub 2005/11/08. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.045> PMID: 16271446.

35. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.* 2006; 86(4):1179–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2005> PMID: 17015488.

Article

Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters

Ágnes Telbisz ^{1,†}, Csilla Ambrus ^{2,3,†}, Orsolya Móznér ^{1,3} , Edit Szabó ¹ , György Várady ¹ , Éva Bakos ¹, Balázs Sarkadi ^{1,4,*} and Csilla Özvegy-Laczka ^{1,*}

¹ Institute of Enzymology, ELKH Research Centre for Natural Sciences, Magyar Tudósok krt. 2, 1117 Budapest, Hungary; telbisz.agnes@ttk.hu (Á.T.); moznér.orsolya@ttk.hu (O.M.); szabo.edit@ttk.hu (E.S.); varady.gyorgy@ttk.hu (G.V.); bakos.eva@ttk.hu (É.B.)

² SOLVO Biotechnology, Irinyi József Street 4-20, 1117 Budapest, Hungary; ambrus@solvo.com

³ Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, Tűzoltó u. 37-47, 1094 Budapest, Hungary

⁴ Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Tűzoltó u. 37-47, 1094 Budapest, Hungary

* Correspondence: sarkadi.balazs@ttk.hu (B.S.); laczka.csilla@ttk.hu (C.Ö.-L.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: During the COVID-19 pandemic, several repurposed drugs have been proposed to alleviate the major health effects of the disease. These drugs are often applied with analgesics or non-steroid anti-inflammatory compounds, and co-morbid patients may also be treated with anticancer, cholesterol-lowering, or antidiabetic agents. Since drug ADME-tox properties may be significantly affected by multispecific transporters, in this study, we examined the interactions of the repurposed drugs with the key human multidrug transporters present in the major tissue barriers and strongly affecting the pharmacokinetics. Our in vitro studies, using a variety of model systems, explored the interactions of the antimalarial agents chloroquine and hydroxychloroquine; the antihelminthic ivermectin; and the proposed antiviral compounds ritonavir, lopinavir, favipiravir, and remdesivir with the ABCB1/Pgp, ABCG2/BCRP, and ABCC1/MRP1 exporters, as well as the organic anion-transporting polypeptide (OATP)2B1 and OATP1A2 uptake transporters. The results presented here show numerous pharmacologically relevant transporter interactions and may provide a warning on the potential toxicities of these repurposed drugs, especially in drug combinations at the clinic.

Keywords: anti-COVID-19 agents; repurposed drugs; APP-Binding Cassette (ABC) transporters; OATP transporters; in vitro functional studies



Citation: Telbisz, Á.; Ambrus, C.; Móznér, O.; Szabó, E.; Várady, G.; Bakos, É.; Sarkadi, B.; Özvegy-Laczka, C. Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 81. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010081>

Received: 21 November 2020

Accepted: 31 December 2020

Published: 9 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

During the COVID-19 pandemic, based on in vitro experimental studies, a number of potential antiviral drugs have been proposed for the clinic. These potential treatments were rapidly brought to the attention of the medical community and the general public by the media, while in many cases, drug evaluation agencies could not properly investigate the pharmacokinetics, potential risks, and benefits. Despite this, clinicians and thousands or even millions of lay people started to compassionately use the advocated off-label compounds. The most notorious example is the wide range off-label use of the antimalarial agents **chloroquine** and **hydroxychloroquine**, in some cases together with zinc or the wide-spectrum antibacterial agent azithromycin. Chloroquine (CQ) and the less toxic analog hydroxychloroquine (HCQ) are efficient antimalarial drugs, increasing the endosomal pH in both the parasites and the host cells. HCQ is also clinically used in autoimmune diseases [1]. However, these compounds were previously found to have major toxicities, especially by prolonging the cardiac QT interval or causing hypoglycemia. CQ and HCQ were both reported to be moderate inhibitors of CYP2D6 and the ABCB1/Pgp transporter. Interestingly, azithromycin has a similar toxicity to CQ and HCQ to prolong the QT interval [2].

The potential use of CQ and HCQ in COVID-19 was initiated by *in vitro* studies, in which both compounds inhibited the fusion of SARS-CoV-2 with the cell membranes, and reduced ACE2 receptor glycosylation (the binding site of SARS-CoV-2) and the transfer of SARS-CoV-2 from early endosomes to lysosomes [3–5]. However, whilst CQ and HCQ—also in combinations with azithromycin—have been examined in several clinical trials, their use has not been approved by the EMA or FDA for the treatment of COVID-19. A recent statement of the NIH COVID-19 Treatment Guidelines Panel (NIH-CTGP) strongly advises against the use of CQ or HCQ because of inefficiency and the cardiac complications [6,7].

Another proposed anti-COVID-19 agent—**ivermectin**—is a broad-spectrum antiparasitic agent and widely used to treat neglected tropical diseases. The target of the antiparasitic action of ivermectin is a glutamate-gated chloride channel and a GABA receptor, specific for some invertebrates. However, in mammals, ivermectin may also inhibit GABAergic neurotransmission by promoting the release of GABA and acting as a GABA receptor agonist. This potentially neurotoxic drug is only absorbed in humans in a very small fraction, and this low-level ivermectin absorption is mainly caused by active extrusion in the intestine by the ABCB1/Pgp transporter. ABCB1, and probably other ABC transporters (especially ABCG2) in the blood–brain barrier (BBB), also have a significant role in protecting the mammalian central nervous system (CNS) against toxic ivermectin penetration. In mouse Pgp-knock-out models, in natural Pgp-knock-out Collie dogs, and also in some humans with low-level ABCB1/Pgp expression, ivermectin exerts major neurotoxicity [8,9]. In addition, both ABCB1 and several other multispecific transporters have been shown to be inhibited by micromolar concentrations of ivermectin [10–12], so ivermectin may influence the pharmacokinetics of several drugs or toxic compounds. Ivermectin was suggested to have anti-CoV-2 effects based on *in vitro* studies, indicating that this compound inhibits the importin alpha/beta-1 nuclear transporter, and thus in cell cultures, reduces the replication of various viruses [13–15], including SARS-CoV-2 [16,17]. However, the ivermectin plasma concentrations required to reach an *in vitro* antiviral efficacy (about 2–10 μ M) are highly toxic, and very high oral doses would be needed for antiviral use [18]. Therefore, in spite of some anecdotal clinical results, ivermectin has not been approved for the treatment of any viral diseases, including SARS-CoV-2 (see the NIH-CTGP). Moreover, in April, 2020, FDA issued a warning not to use ivermectin to treat COVID-19 in humans.

Several approved and clinically effective HIV protease inhibitors, including **ritonavir** and **lopinavir**, based on their potential for inhibiting other viral proteases, also entered clinical trials as anti-COVID-19 agents. SARS-CoV-2 virus replication requires the cleavage of viral polyproteins, and the proteases 3CLpro and PLpro are responsible for this cleavage. *In vitro*, lopinavir and ritonavir were found to inhibit 3CLpro, and thus reduce SARS-CoV-2 replication [19]. However, these drugs are poorly selective and high concentrations are required to achieve *in vivo* inhibition [20]. Therefore, the current NIH-CTGP recommends against the use of these compounds for COVID-19 treatment, except in a clinical trial. The NIH-CTGP also warns that the lopinavir/ritonavir combination is a strong inhibitor of cytochrome CYP3A, so co-treatment with numerous drugs metabolized by CYP3A may result in increased toxicities. Ritonavir induces CYP1A2 and inhibits CYP3A4 and CYP2D6. Therefore, it may cause serious drug–drug interactions. Ritonavir and lopinavir are inhibitors of ABC multidrug transporters [21,22], both *in vitro* and *in vivo* [23], and according to studies with labeled ritonavir and lopinavir, these agents are transported substrates of ABCB1/Pgp [24,25], but not of ABCG2/BCRP [26,27].

Recently developed antiviral agents, despite having been found to be minimally effective in earlier clinical studies and not approved for general use, have also been introduced in COVID-19 clinical trials. **Favipiravir** (Avigan) is a pyrazinecarboxamide derivative antiviral agent, administered as a prodrug in both oral and intravenous formulations. The active form is an inhibitor of the viral RNA-dependent RNA polymerase and thus reduces the viral load. Favipiravir was approved in Japan against special cases of influenza, although it was found to be ineffective in human airway cells [28]. Favipiravir degradation mostly occurs by aldehyde oxidase (AO) and xanthine oxidase. Since favipiravir was found

to inhibit CYP2C8, co-administration with CYP2C8 substrates may increase some drug effects. Since favipiravir is often used together with acetaminophen, it is important to note that favipiravir inhibits acetaminophen sulfate formation. In addition, favipiravir has been shown to have a teratogenic effect in animals [29]. Currently, the use of favipiravir in treating COVID-19, despite only having limited clinical data for its efficiency in this disease, has been approved in China, India, and for emergency use in Japan, while this agent remains unapproved in Europe and the USA.

Remdesivir (Veklury) is a broad-spectrum antiviral medication employed for intravenous injection provided in a sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBECD) complex. Remdesivir (RDV) itself is a prodrug, and its active triphosphate metabolite is a ribonucleotide analogue inhibitor of viral RNA polymerase. Remdesivir was developed for the treatment of hepatitis C and Ebola virus diseases, while based on initial clinical trials, it has been authorized for emergency use in COVID-19 in numerous countries, especially for patients with severe symptoms. In October 2020, FDA authorized the clinical use of remdesivir against COVID-19, while the WHO still does not support its use in this disease. Preclinical studies indicated that remdesivir is not a substrate of CYP2C8, CYP2D6, or CYP3A4, and is not “significantly” transported by ABCB1/Pgp or the organic anion-transporting polypeptide (OATP)-type drug transporters [30], while detailed studies on remdesivir–drug interactions are not yet available. Remdesivir in *in vitro* studies was metabolized by CYP2C8, 2D6, and 3A4, while *in vivo* studies indicate its metabolism by hydrolases. Remdesivir at the clinic is applied in the form of a sulfobutyl ether beta-cyclodextrin (SBECD) complex, thus, in addition to remdesivir, we have also used this cyclodextrin complex in our *in vitro* studies.

In order to explore the multispecific drug transporter interactions of the above repurposed drugs (see Table 1), in this investigation, we performed a detailed *in vitro* study on their potential interaction with several key multidrug transporters. We focused on the potential role of the transporter–drug interactions in the important tissue barriers, especially the intestinal epithelium and the blood–brain barrier (BBB) endothelial cells (see <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#major> (2017)).

Table 1. Mechanism of action of the potential anti-COVID-19 drugs examined in this study.

Potential Anti-COVID-19 Compounds	Mechanism of Action
chloroquine	Antimalarial—endosomal pH increase
hydroxychloroquine	Antimalarial—endosomal pH increase
ivermectin	Antiparasitic—glutamate-gated chloride channel and a GABA receptor inhibitor
lopinavir	(HIV) protease inhibitor
ritonavir	(HIV) protease inhibitor
remdesivir	Viral RNA-polymerase inhibitor
favipiravir	Viral RNA-polymerase inhibitor

The ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP efflux transporters are key proteins for xenobiotic extrusion in the intestine and BBB, while they are also involved in toxin and drug metabolism in the liver and kidney [31–33]. In addition to several endogenous substrates, including conjugated metabolites, steroids, and uric acid, there is a wide range of environmental and food-related toxic molecules actively transported by these proteins. Therefore, they are major players in drug–drug interactions. While, in most model animals, Pgp is the major drug transporter in the BBB, in primates and humans, ABCG2 seems to be the key protective transporter in this tissue [34–36]. In addition, ABCC1 has a role in the blood–cerebrospinal barrier to avoid CNS toxicity [37].

Organic anion-transporting polypeptides (OATPs) belong to the Solute Carrier (SLC) family and some of them (e.g., OATP1A2, 1B1, 1B3, and 2B1) are well-documented multispecific plasma membrane xenobiotic and drug transporters involved in the cellular uptake

of various organic molecules (“uptake transporters”) [38]. OATP1B1 and OATP1B3 are important in liver drug metabolism, while OATP1A2 and OATP2B1 are expressed in a variety of human tissues [39]. These latter transporters are highly expressed in the intestine, while OATP1A2 is the key drug uptake transporter expressed in the BBB endothelial cells, promoting drug uptake from the blood plasma into the CNS [40–42]. Therefore, OATPs 1A2 and 2B1 are important players in the pharmacokinetics of numerous drugs, either being substrates or inhibitors of these transporters. Based on both in vitro and clinical data, OATP1A2 and OATP2B1 are key players in the intestinal uptake of a large variety of clinically important drugs, including statins, fexofenadine, sulfasalazine, steroids, and telmisartan, while they may be significantly inhibited by chemotherapeutics or antiviral compounds [42]. In addition, they contribute to the tissue penetration of numerous endogenous substrates, including steroid and thyroid hormones, prostaglandins, bile acids, and bilirubin [43]. Based on their important role in tissue barriers and drug pharmacokinetics, we studied the potential inhibition of the function of ABCB1, ABCG2, ABCC1, OATP2B1, and OATP1A2 by the clinically applied anti-COVID-19 agents. In these experiments, we used an array of in vitro functional transporter assays which, together, may provide important new information regarding the potential ADME-tox properties of these agents.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All basic laboratory reagents were obtained from Sigma Aldrich. The 5D3 antibody was a kind gift from B. Sorrentino, St. Jude Children Hospital, Memphis, USA, and remdesivir and remdesivir-SBECN were kind gifts from Lajos Szente, Cyclolab Ltd., Budapest, Hungary. Vesicular assay membranes and components were obtained from SOLVO Biotechnology, Budapest, Hungary (<https://www.solvobiotech.com/services/categories/>).

2.2. ABC Transporter Assays

For the ABC transporter assays, we used both cell-based and membrane-based functional assays. For assaying the function of the ABC transporters in cell-based assays, we applied stable cell lines expressing the transporters ABCG2 PLB-985, ABCB1 PLB-985, and ABCC1 HL-60, and their parental lines, which lack significant ABC transporter expression [44]. The respective transport activities were assayed by measuring the cellular fluorescence of the respective transported substrates PhenGreen (ABCG2) and Calcein (ABCB1 and ABCC1) [44]. For the ABCG2 transport assay, we also used HeLa cells stably expressing the wild-type or Q141K polymorphic variant of the ABCG2 protein (see below).

For studying ABCB1 and ABCC1 transport, 5×10^4 parental control or transporter-containing cells were incubated with 0.25 μM Calcein-AM (C3100MP ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in phosphate buffered saline (PBS) containing 1 g/L D-glucose (DPBS) for 40 min at 37 °C. The test compounds were applied in 0.2–50 μM , and as specific transporter inhibitors, 0.25 μM tariquidar (TQ, which was a kind gift from Dr. S. Bates (NCI, NIH)) for ABCB1 and 10 μM indomethacin (IM, I0200000, Sigma-Aldrich-Merck, St. Louis, MO, USA) were used. The cells were kept on ice until the flow cytometry measurements. All experiments were performed in triplicate and in at least three biological parallels.

For examining the function of ABCG2, 5×10^4 parental control or ABCG2 transporter-expressing cells were incubated with 0.25 μM PhenGreen-SK diacetate (P14313, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in DPBS containing 1 μM EDTA, for 40 min at 37 °C. The test compounds were applied in 0.2–50 μM , and as a specific transporter inhibitor, 2.5 μM Ko143 (3241, Tocris Bioscience, Bristol, UK) was applied. The cells were kept on ice until the flow cytometry measurements. All experiments were performed in triplicate and in at least three biological parallels. Cellular fluorescence reflecting the transport activity was measured by an Attune Nxt cytometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a blue (488 nm) laser. The PhenGreen (PG) or Calcein signal was detected in the BL1 channel (emission filter: 530/30 nm). Analysis of the data was carried out by the Attune Nxt Cytometer Software v3.1.2 (Thermo Fischer

Scientific, Waltham, MA, USA). The inhibition of transporter activity was calculated by comparing the fluorescence in the presence of the test compound to that in the presence of a specific inhibitor providing maximum inhibition. Higher concentrations of some of the investigated compounds also altered the fluorescence of Calcein in the parental cells in an ABC transporter-independent way (parental cells had no significant ABC transporter expression, as tested by specific inhibitors), and these data were used for correction of the data obtained in ABC transporter-expressing cells. Half-maximum inhibition (IC_{50}) values were calculated by using the Origin2019 software (9.6.5.169, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). In addition to studies on the wild-type ABCG2 transporter, we also examined the effects of drugs on the function of a relatively frequent (present in up to 20–35% of the population) polymorphic variant—the Q141K-ABCG2 (SNP rs2231142) transporter. In these experiments, we measured Hoechst dye extrusion in HeLa cells stably expressing eGFP and the ABCG2 variants driven by the same promoter—the transgenic cells generated by the Sleeping Beauty transposon system. These cells were sorted based on similar levels of eGFP, and ABCG2 expression was examined by a monoclonal (5D3) antibody-based flow cytometry assay (Q141K-ABCG2 cell surface expression was approximately 80% of the wild-type ABCG2 expression. For details, see Zámbo et al. [45]). For the ABCG2 transporter inhibition assay, trypsinized HeLa cells expressing the ABCG2 wild-type (WT) or Q141K variant were incubated in a shaker for 20 min at 37 °C in HPMI buffer (20 mM HEPES, 132 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 5 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$ [pH 7.4]) with 0.2 μ M of Hoechst 33342 (H1399, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dye, in the presence of the tested drugs or 1 μ M of the specific ABCG2 inhibitor Ko143 (3241, Tocris Bioscience, Bristol, UK). Following incubation, the cells were put on ice and Hoechst dye fluorescence was measured using the violet laser (405 nm) and VL1 detector on the Attune Nxt Cytometer. Cells showing similar eGFP fluorescence were gated in the case of the WT and Q141K variants. The maximum inhibition was defined for each variant as the fluorescence difference of the samples incubated with and without Ko143, respectively. All tested drugs (ivermectin, remdesivir, ritonavir, lopinavir, and Ko143) were dissolved in DMSO, and the same DMSO concentration (below 0.5%) was applied for all drug concentrations examined. Data analysis was performed using the Attune Nxt Cytometer Software v3.1.2. Two samples per condition and three biological replicates were examined in each experiment.

For studying the vesicular ATP-dependent transporter activity of the ABC transporters, we used ABCB1/Pgp or ABCG2/BCRP containing HEK-293 cell membrane vesicles, as well as ABCC1/MRP1 containing Sf9 membrane vesicles, prepared by Solvo Biotechnology. Membrane vesicles (12.5 μ g protein/sample) were incubated with transporter-specific substrates: For ABCG2, 5 μ M lucifer yellow (LY) as a fluorescent substrate and the radiolabeled substrate probes; for ABCB1, 1 μ M N-methyl quinidine (NMQ); and for ABCC1, 0.2 μ M estradiol-glucuronide (ETGB). These were employed at 37 °C for 10 min (ABCG2), 1 min (ABCB1), or 3 min (ABCC1), with or without 4 mM Mg-ATP, in a 50 μ L final volume. The known reference inhibitors of the transporters (1 μ M Ko143 for ABCG2, 1 μ M Valspodar for ABCB1, and 200 μ M Benzbromarone for ABCC1) served as controls. Each test compound was dissolved in DMSO and a 1 μ L volume was added to the samples. After incubation, the samples were filtered and washed, and the substrates in the vesicles were dissolved in 10% SDS and transferred onto another plate. After the addition of a stabilizer, the fluorescence was measured in plate readers (Victor X3 and Enspire Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA), while the activity of the radiolabeled substrate was measured by liquid scintillation counting (Perkin Elmer MicroBeta2 liquid scintillation counter, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). ABC transporter-related vesicular transport was calculated by subtracting uptake measured in the presence of Mg-AMP from the values measured in the presence of Mg-ATP. No significant quenching by the test compounds was observed.

ABC transporter ATPase activity was measured in Sf9 membrane vesicles containing the respective human ABC transporters [46–50]. For ABCG2/BCRP, the cholesterol level in the vesicles was increased to the level of mammalian cell membranes for full activity [49].

For ABCB1/Pgp 20 µg/150 µL and for ABCG2/BCRP 10 µg/150 µL, vesicles were incubated with 3 mM Mg-ATP for 25 min at 37 °C. The test drugs were dissolved in DMSO and 1 µL was added to the samples. The ABC transporter-related ATPase activity was determined and reference activators (50 µM verapamil for ABCB1 and 5 µM quercetin for ABCG2) served as controls.

2.3. OATP Transporter Assays

For studying the function of the multispecific uptake transporters OATP1A2 and OATP2B1, we used A431 human tumor cells overexpressing these human proteins and mock transfected A431 cells as controls, generated as previously described [47,51]. The interaction between OATPs and the potential anti-COVID-19 agents was studied by employing fluorescent dye substrates: Pyranine for OATP2B1 and sulforhodamine 101 for OATP1A2 [51,52].

Briefly, A431 cells overexpressing OATP1A2 or OATP2B1 [47] were seeded on 96-well plates, washed three times with 200 µL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), and pre-incubated with 50 µL uptake buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 12 mM MgSO₄, 25 mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, and 5.6 mM glucose, pH 5.5 for OATP2B1 and pH 7.0 for OATP1A2) at 37 °C, with or without increasing concentrations of the tested compounds. The test compounds were dissolved in DMSO (maximum 0.5%), and the reaction was started by the addition of a final concentration of 20 µM pyranine (OATP2B1) or 0.5 µM sulforhodamine 101 (OATP1A2). After incubation at 37 °C for 15 min (OATP2B1) or 10 min (OATP1A2), the reactions were stopped and the cells were washed three times with ice-cold PBS. Fluorescence was measured in an Enspire plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) (ex/em: 403/5 and 517/5 nm (pyranine) or 586/5 and 605/5 nm (sulforhodamine 101)), and the OATP-dependent transport activity was determined by comparing the data to those obtained from mock transfected cells. In all experiments, three biological replicates were used and IC₅₀ values were calculated by using GraphPad prism software (version 5.01, GraphPad, La Jolla, CA, USA). Due to the high level of specific transporter expression, background transport was very low in these cells (see reference [47]).

3. Results

3.1. Interaction of Anti-COVID-19 Drug Candidates with ABCB1/MDR1/Pgp

In these experiments, we applied several independent in vitro methods to explore the drug interactions with this transporter. We measured ABCB1-related fluorescent substrate (Calcein-AM) transport inhibition in intact model cells, inhibition of the vesicular transport of an established ABCB1 substrate N-methyl quinidine (NMQ) in mammalian cell membrane vesicles, and drug-dependent ABCB1-ATPase activity in isolated insect (*Sf9*) cell membranes (see Figure 1). In all cases, previously well-characterized cells or membranes with highly expressed ABCB1 levels were applied, so the data can be compared to numerous similar studies in the relevant scientific literature.

3.1.1. Transport Assays in Intact Human PLB-985/ABCB1 Cells

ABCB1 is a high-affinity active efflux transporter of the viability dye Calcein-AM (CaAM). The cellular uptake of the non-fluorescent CaAM is strongly inhibited by the extrusion of this compound by the ABCB1 transporter, so the cellular fluorescence of the intracellularly formed free Calcein is strongly reduced in cells expressing ABCB1 [53]. Here, we applied this widely used cellular assay (see <https://www.solvobiotech.com/services/categories/dye-efflux-assays>) to characterize drug interactions of the applied compounds in intact PLB-985 cells, expressing high levels of the ABCB1 protein. Maximum inhibition of the transporter was achieved by 0.25 µM tariquidar (TQ), which is a third-generation specific inhibitor of ABCB1. ABCB1 inhibition by the test compounds was estimated by their relative (%) inhibition compared to full inhibition by TQ. As shown in Figure 1A,B, ivermectin caused a strong inhibition of the ABCB1-dependent CaAM

extrusion at low micromolar concentrations (estimated IC_{50} of 0.6 μM), while chloroquine and hydroxychloroquine had practically no effect on this ABCB1-dependent transport. Figure 1B documents the effects of lopinavir, ritonavir, favipiravir, and remdesivir on the CaAM extrusion by ABCB1. Favipiravir, remdesivir, and its cyclodextrin complex did not significantly inhibit the transport activity of ABCB1. In contrast, lopinavir and ritonavir caused a strong inhibition of the ABCB1-dependent CaAM extrusion at low micromolar concentrations (estimated IC_{50} values of 6.3 and 8.4 μM , respectively).

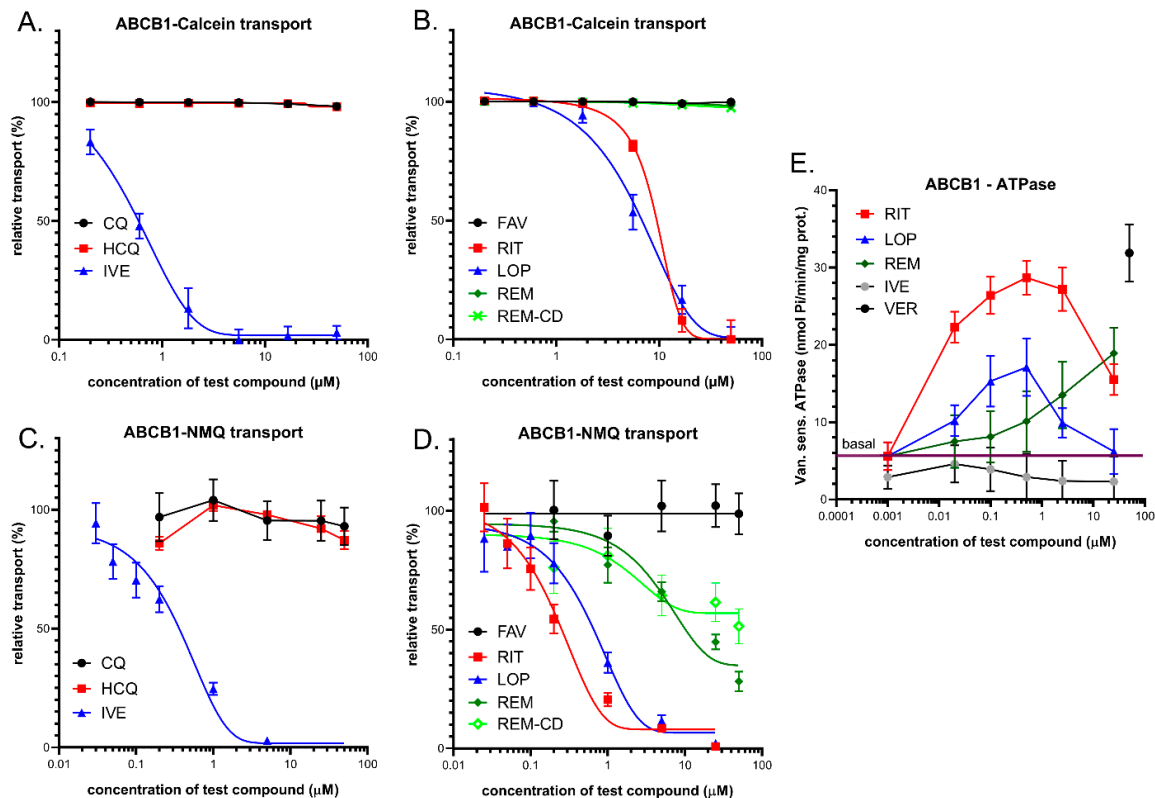


Figure 1. (A,B) Inhibition of ABCB1-mediated Calcein-AM (CaAM) extrusion in intact ABCB1 expressing PLB-985 cells. (A) Effects of ivermectin (IVE), chloroquine (CQ), and hydroxychloroquine (HCQ). (B) Effects of lopinavir (LOP), ritonavir (RIT), favipiravir (FAV), remdesivir (REM), and cyclodextrin formulated remdesivir (REM-CD). (C,D) Inhibition of ABCB1-mediated N-methyl quinidinium (NMQ) transport in the vesicular transport assay. (E) ABCB1-ATPase activity in isolated Sf9 membrane vesicles. Effects of ivermectin, lopinavir, ritonavir, and remdesivir. As a reference substrate, verapamil (VER) was used. The basal line represents the ATPase activity level without the addition of any drug. Data on the graphs show the average of at least three independent experiments, \pm SD or SEM (E) values.

3.1.2. Vesicular Transport Studies in HEK/ABCB1 Membrane Vesicles

In these experiments, we studied the effects of the potential anti-COVID-19 compounds in a vesicular transport assay by using inverted membrane vesicles prepared from HEK-293 cells expressing high levels of the ABCB1 transporter. In the inverted membrane vesicle measurements, labeled substrates and the investigated compounds were both applied on the cytoplasmic side of the membrane, which excludes most of the complex intracellular drug interactions. The modulation of the ATP-dependent vesicular uptake of a specific ABCB1 probe substrate directly reveals drug interactions with the transporter. In the present work, we measured the uptake of 3H -N-methyl-quinidinium (NMQ), which is a labeled low-permeability amphipathic substrate of the human ABCB1/MDR1/Pgp [54,55]. Transport inhibition (%) of this labeled substrate by the test compounds was calculated by setting probe substrate transport in the absence of test compounds as 100%. As shown in Figure 1C, in ABCB1 expressing membrane vesicles, ivermectin caused a strong inhibition of the ATP-dependent NMQ uptake at low micromolar concentrations (estimated IC_{50}

of 0.3 μM), while chloroquine and hydroxychloroquine had practically no effect on this transport activity. Figure 1D shows the effects of lopinavir, ritonavir, favipiravir, and remdesivir on the transport activity of ABCB1. As documented, lopinavir and ritonavir are strong inhibitors of this transport (estimated IC_{50} values are 0.6 and 0.3 μM , respectively), remdesivir and remdesivir-SBECED are weak inhibitors of ABCB1 (IC_{50} above 20 μM), and favipiravir had no inhibitory effect.

3.1.3. ABCB1-ATPase Activity Measurements in Sf9 Membranes

Drug-stimulated ATPase activity of the ABCB1 transporter is a well-documented functional assay employed to estimate the substrate or inhibitory features of various drugs. ATP-dependent substrate transport is reflected in the activation of this specific ATPase activity in most cases, and in many cases, drug-stimulated ABCB1-ATPase has been shown to correlate with the substrate affinity. In this assay, most transported substrates show a biphasic curve: Low concentrations stimulate, while higher concentrations inhibit, the ATPase activity [46]. In these experiments, we measured the vanadate-sensitive (ABC transporter-related) ABCB1-ATPase activity in membrane vesicles isolated from ABCB1 overexpressing Sf9 cells [46,49]. Sf9 cells exhibit low intrinsic membrane ATPase activity, so both the baseline and the drug-stimulated ATPase activity of the ABCB1 protein can be measured. High-level stimulation of this ATPase activity can be achieved by 50 μM of verapamil—a transported substrate of ABCB1—serving as a positive control in this assay. As shown in Figure 1E, several tested compounds significantly increased the ABCB1-ATPase activity in this assay. Low micromolar concentrations of ritonavir (EC_{50} less than 0.1 μM) stimulated the ATPase activity up to the level of verapamil activation, and both lopinavir (EC_{50} about 0.05 μM) and remdesivir (EC_{50} about 10 μM) showed significant ABCB1-ATPase stimulation. Ritonavir and lopinavir exhibited maximal stimulation at around 0.5 μM , whereas remdesivir only increased the ATPase activity at 10–50 μM . At higher concentrations, ritonavir and lopinavir displayed inhibitory effects. Ivermectin only showed ABCB1-ATPase inhibition.

3.2. Interaction of Anti-COVID-19 Drug Candidates with ABCC1/MRP1

3.2.1. Transport Assay in Intact Human Cells—HL60/ABCC1 Cells

ABCC1, similarly to ABCB1, is a high-affinity active efflux transporter for Calcein-AM and the cellular fluorescence of free Calcein is also reduced in cells expressing ABCC1 [56]. Therefore, we applied this assay to characterize the test drug interactions in intact HL60 cells expressing high levels of the ABCC1 protein. Maximum inhibition of the transporter was achieved by 10 μM of indomethacin (IM), which is a strong inhibitor of ABCC1. ABCC1 inhibition by the test compounds was estimated by their relative (%) inhibition compared to full inhibition by IM. As shown in Figure 2A, ivermectin caused a strong inhibition of the ABCC1-dependent CaAM extrusion at low micromolar concentrations (estimated IC_{50} of 3.3 μM), while chloroquine and hydroxychloroquine had practically no effect. As documented in Figure 2B, lopinavir and ritonavir had strong inhibitory effects, with estimated IC_{50} values of 10.7 and 7.7 μM , respectively. Favipiravir, remdesivir, and its cyclodextrin complex did not significantly inhibit the cellular transport activity of ABCC1 (a slight inhibition by higher concentrations of remdesivir was observed).

3.2.2. Vesicular Transport Studies in Sf9/ABCC1 Membrane Vesicles

In this study, we measured the effects of the test compounds in a vesicular transport assay by using inverted membrane vesicles prepared from Sf9 cells expressing high levels of the ABCC1 transporter. We measured the uptake of ^3H -estradiol-17 β -glucuronide (ETGB), which is a labeled substrate of the human ABCC1/MRP1 transporter [57]. Relative inhibition (%) was calculated by setting probe substrate transport in the absence of test compounds as 100%. As shown in Figure 2C, in ABCC1 expressing membrane vesicles, lopinavir caused an inhibition of the ATP-dependent ETGB uptake in a dose-dependent manner, with a maximum inhibition of 60% at the highest applied concentration. Ivermectin

inhibited the ABCC1-mediated ETBG accumulation, with a maximum inhibition of 80% at a 25 μM concentration. Ritonavir, favipiravir, chloroquine, and hydroxychloroquine had practically no effect on this transport activity (CQ and HCQ not shown), while, interestingly, remdesivir significantly stimulated the vesicular ETGB transport activity of ABCC1, although only at above 25 μM .

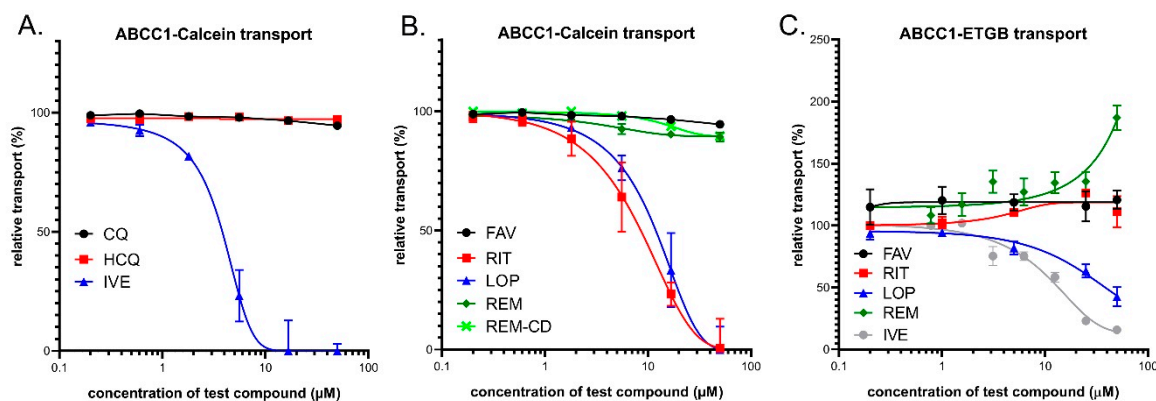


Figure 2. (A,B) Inhibition of ABCC1-mediated CaAM extrusion in intact HL60 cells. Panel C: Inhibition of ABCC1-mediated vesicular uptake of ^3H -estradiol-17 β -glucuronide (ETGB). Panel (A) Effects of ivermectin (IVE), chloroquine (CQ), and hydroxychloroquine (HCQ). (B) Effects of lopinavir (LOP), ritonavir (RIT), favipiravir (FAV), remdesivir (REM), and SEBCD-remdesivir (REM-CD). (C) Effects of ivermectin (IVE), lopinavir (LOP), ritonavir (RIT), favipiravir (FAV), and remdesivir (REM).

3.3. Interaction of Anti-COVID-19 Drug Candidates with ABCG2

3.3.1. Transport Measurements in Intact Human Cells—PLB/ABCG2 and HeLa/ABCG2

The ABCG2 protein does not transport Calcein AM, so this assay cannot be used for assaying ABCG2 activity in intact cells. In contrast, several fluorescent dyes, including Hoechst 33342 (Hst), DyeCycle violet (DCV), and PhenGreen-SK diacetate (PG-DA), are actively extruded by the ABCG2 transporter [44,58–63], providing an opportunity for fluorescence-based cellular assays. Here, we used both PhenGreen-SK diacetate and Hst dye for these measurements. The PhenGreen (PG) assay is a recently patented method applied for ensuring an efficient ABCG2 transport measurement, as the non-fluorescent PhenGreen diacetate (PG-DA) is actively extruded by ABCG2 and the cellular fluorescence is correlated with ABCG2 transport activity [44]. Therefore, we applied this assay to characterize the test drug interactions in intact PLB-985 cells expressing high levels of the ABCG2 protein. Maximum inhibition of the transporter was achieved by 2.5 μM of Ko143, which is a high-affinity specific inhibitor of ABCG2. ABCG2 inhibition by the test compounds was estimated by their relative (%) inhibition compared to full inhibition by Ko143. As shown in Figure 3A,B, ivermectin caused a strong inhibition of the ABCG2-dependent PG-DA extrusion at micromolar concentrations (estimated IC_{50} of 3.1 μM). Lopinavir and ritonavir also had strong inhibitory effects, with estimated IC_{50} values of 13.1 and 8.3 μM , respectively. Favipiravir, chloroquine, and hydroxychloroquine had practically no effect on this ABCG2-dependent transport. Remdesivir and its complex are relatively weak inhibitors of the ABCG2-dependent PG-DA extrusion at micromolar concentrations (estimated IC_{50} values are greater than 40–50 μM).

3.3.2. Vesicular Transport Studies in HEK/ABCG2 Membrane Vesicles

The effects of the test compounds on ABCG2 activity were also measured in a vesicular transport assay by using inverted membrane vesicles prepared from HEK-293 cells expressing high levels of the ABCG2 transporter. The ATP-dependent uptake of lucifer yellow (LY), which is a substrate of the human ABCG2/BCRP transporter [64], was measured, and inhibition of this fluorescent substrate uptake by the test compounds was compared to a full inhibition achieved by 1 μM of Ko143. As shown in Figure 3C,D, in ABCG2

containing HEK-293 cell membrane vesicles, ivermectin caused a strong inhibition of the ATP-dependent LY uptake at low micromolar concentrations (estimated IC_{50} of 1.1 μM), while chloroquine and hydroxychloroquine had practically no effect. Lopinavir, ritonavir, and remdesivir, as well as remdesivir-cyclodextrin, inhibited the transport activity of ABCG2, with estimated IC_{50} values of 4.2, 7.5, and more than 20 μM , respectively.

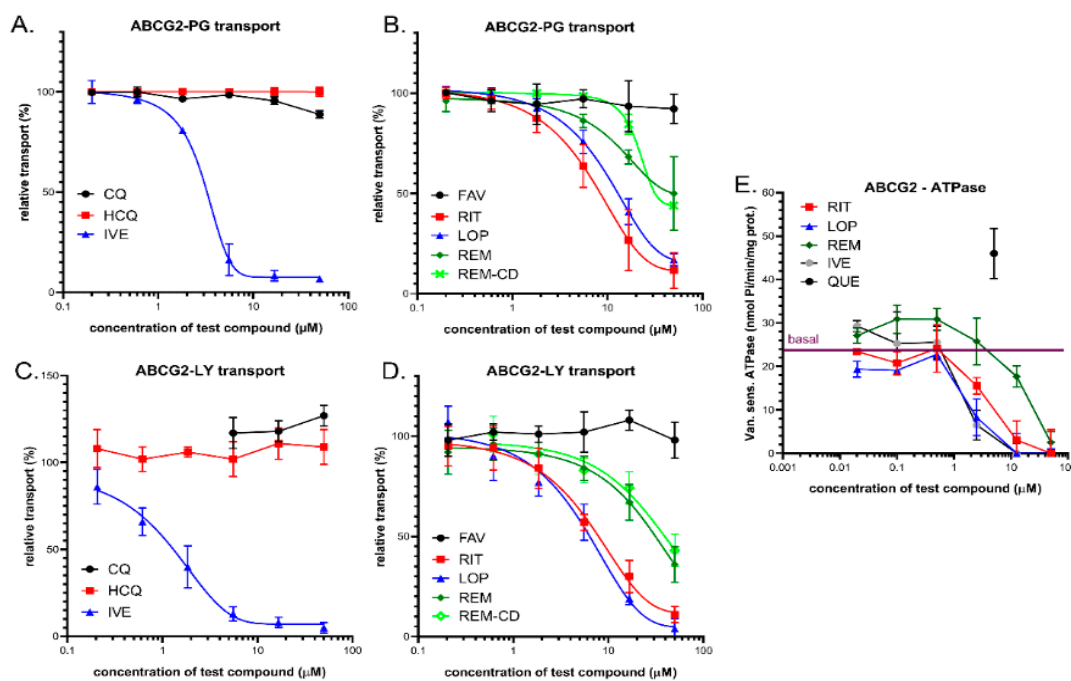


Figure 3. (A,B) Inhibition of ABCG2-mediated PhenGreen (PG)-AM extrusion in intact PLB-985 cells. Panel A: Effects of ivermectin (IVE), chloroquine (CQ), and hydroxychloroquine (HCQ). Panel B: Effects of lopinavir (LOP), ritonavir (RIT), favipiravir (FAV), remdesivir (REM), and SEBCD-remdesivir (REM-CD). (C,D) Inhibition of ABCG2-mediated lucifer yellow (LY) transport in the vesicular transport assay. (E) ABCG2-ATPase activity in isolated Sf9 membrane vesicles. Effects of ivermectin, lopinavir, ritonavir, and remdesivir. Maximum ATPase stimulation was obtained by 5 μM quercetin. Data on the graphs show the average of at least three independent experiments, \pm SD (A,B) or SEM (C–E) values.

3.3.3. ABCG2-ATPase Activity Measurements in Sf9 Membranes

Drug-stimulated ATPase activity of the ABCG2 transporter was also measured in the present study. This functional assay may be used to estimate the substrate/inhibitory features of various drugs (see 1.E, and [50]). Here, we measured the vanadate-sensitive ABCG2-ATPase activity in membrane vesicles isolated from ABCG2 overexpressing Sf9 cells [50], and the maximum stimulation of this ABCG2-ATPase activity was achieved by the transported substrate—5 μM quercetin—serving as a positive control in this assay. As shown in Figure 3E, ivermectin, ritonavir, and lopinavir at low micromolar concentrations, and remdesivir at higher concentrations (around 20–50 micromoles), significantly inhibited the baseline ABCG2-ATPase activity. None of the tested compounds displayed significant ABCG2-ATPase stimulation effects. Therefore, the assay was not informative regarding their potential transported substrate nature.

3.3.4. Effect of the Q141K-ABCG2 Polymorphism on the Inhibitory Potential of the Test Drugs

The very frequent (present in 12–35% in various populations) Q141K-ABCG2 polymorphic variant has been reported to have lower membrane expression levels and reduced transport activity in various assay systems [65]. Since ivermectin, lopinavir, ritonavir, and remdesivir resulted in well-measurable inhibition of the ABCG2-dependent PG dye extrusion activity (see above), we performed similar studies in HeLa cells stably expressing either the wild-type ABCG2 or the Q141K-ABCG2 variant [45]. In this case, we measured

the extrusion of the Hoechst 33342 dye, which is another transported substrate of ABCG2, and once again used the specific inhibitor Ko143 to achieve full inhibition of the transporter. As shown in Figure 4, ivermectin (A), ritonavir (B), and lopinavir (C) also inhibited Hst dye extrusion by ABCG2 in the HeLa cells, and remdesivir (D) had a slight effect at relatively high concentrations. An important finding was that Hst dye extrusion in HeLa cells expressing the Q141K-ABCG2 variant showed a higher sensitivity to all drug inhibition.

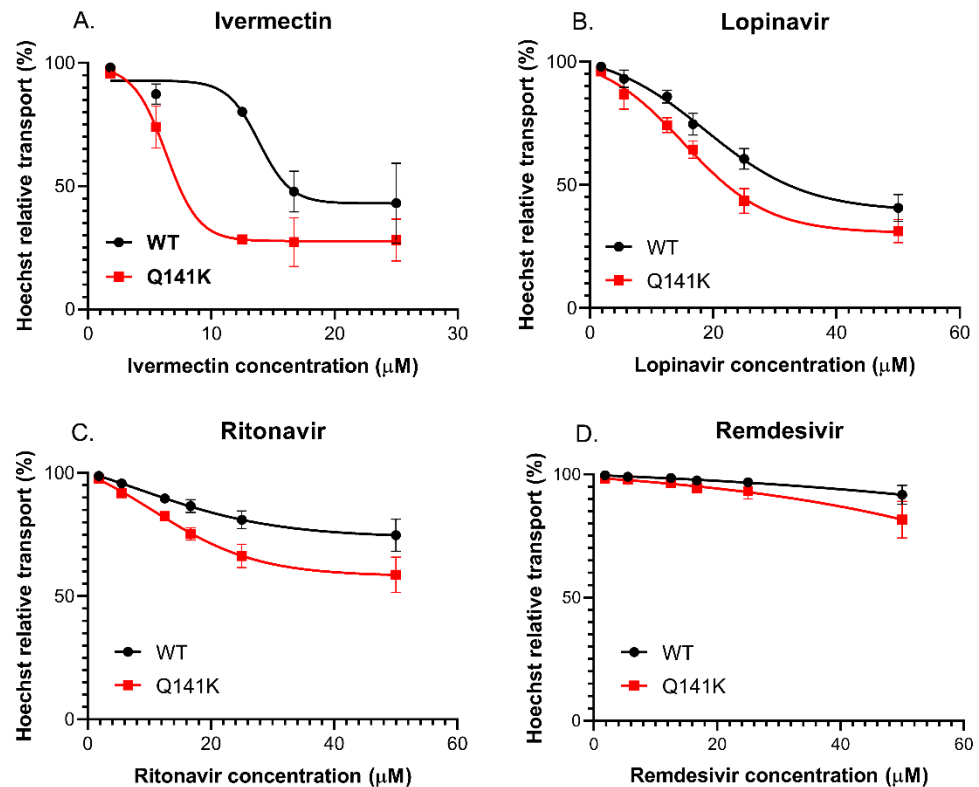


Figure 4. Hoechst 33342 dye extrusion in HeLa cells stably expressing the WT and Q141K variants of ABCG2. Different concentrations of ivermectin (A), lopinavir (B), ritonavir (C), and remdesivir (D) were used to determine their effect on ABCG2 function. Data on the graphs show the average of three independent experiments, \pm SD values.

3.4. Interaction of Anti-COVID-19 Candidates with OATP1A2 and OATP2B1 Transporters

In order to explore potential interactions between the potential anti-COVID-19 drugs and OATP1A2 or OATP2B1, the compounds were investigated in a fluorescence-based cellular transport assay recently developed by our laboratory [47,51]. The uptake of pyranine or sulforhodamine 101 as test substrates was measured in A431-OATP1A2 or A431-OATP2B1 cells, and mock transfected A431 were used as the negative control. As shown by Figure 5, with the exception of favipiravir, all of the compounds examined inhibited OATP1A2 function. Based on the IC_{50} values, the antivirals lopinavir, ritonavir, remdesivir, and the anti-parasitic ivermectin exhibited similar affinities towards OATP1A2. On the other hand, although still effective, chloroquine and hydroxychloroquine were 3–10-fold lower affinity inhibitors (see Table 2). Interestingly, cyclodextrin resulted in a slightly decreased inhibitory potential of remdesivir on OATP1A2 function (Figure 5, and Table 2). In the case of OATP2B1, a similar inhibitory potency was observed for the antiviral compounds, as in the case of OATP1A2. Lopinavir and ritonavir were the highest affinity inhibitors, with IC_{50} values of 1.0 and 1.4 μM , respectively, and remdesivir, the remdesivir-cyclodextrin complex, and ivermectin had lower inhibitory effects, with IC_{50} values of 3.8, 5.6, and 8.6 μM , respectively. Chloroquine and hydroxychloroquine exerted only modest inhibition of OATP2B1 activity, and favipiravir showed no interaction with this transporter.

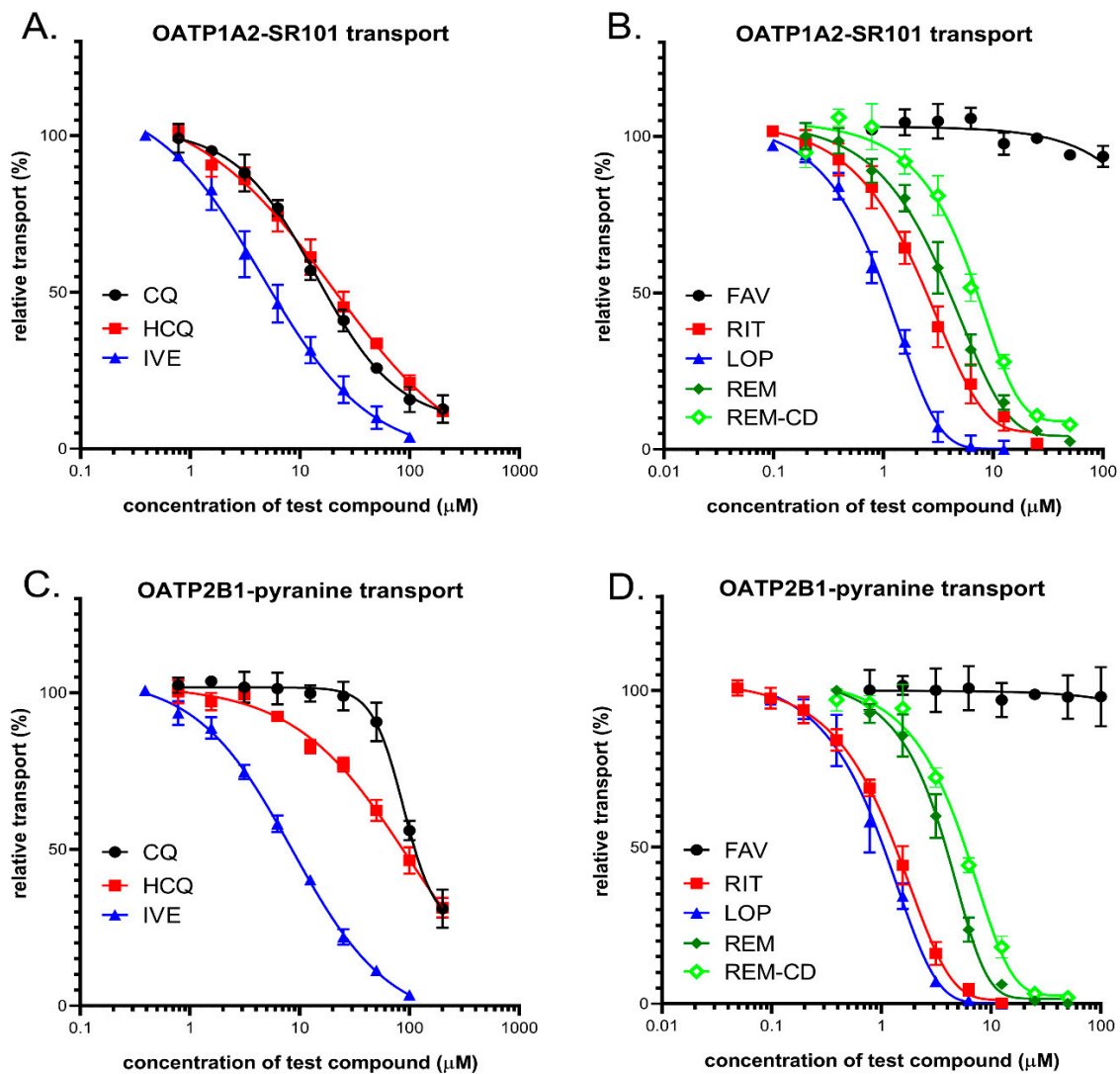


Figure 5. (A,B) Inhibition of OATP1A2-mediated sulforhodamine101 (SR101) uptake by potential antiviral compounds. Uptake of 0.5 μM SR101 was measured in A431-OATP1A2 cells seeded on 96-well plates for 10 min in the presence of increasing concentrations of ivermectin (IVE), chloroquine (CQ), hydroxychloroquine (HCQ), favipiravir (FAV), lopinavir (LOP), ritonavir (RIT), remdesivir (REM), and SEBCD-remdesivir. (C,D) Inhibition of OATP2B1-mediated pyranine uptake by different antiviral compounds. Uptake of 20 μM pyranine was measured in A431-OATP2B1 cells for 15 min in increasing concentrations of the tested compounds. In all cases, averages were obtained based on at least three biological replicates. \pm SD values are shown.

Table 2. Summary of the transporter inhibition properties of the drugs examined. Approximate IC_{50} (μM) values were determined by nonlinear regression analysis of the data shown in the results section, using GraphPad prism software (version 5.01, GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Potential anti-COVID-19 compounds	Estimated Transporter Inhibition— IC_{50} (μM)						OATP Cellular Assays	
	ABCB1		ABCC1		ABCG2		OATP1A2	OATP2B1
	cellular assay	vesicular assay	cellular assay	vesicular assay	cellular assay	vesicular assay		
chloroquine	-	-	-	-	-	-	17.0	119
hydroxychloroquine	-	-	-	-	-	-	18.9	84
ivermectin	0.6	0.3	3.3	13.3	3.1	1.1	5.2	8.6
lopinavir	6.3	0.6	10.7	10	13.1	4.2	1.5	1.0

Table 2. Cont.

	Estimated Transporter Inhibition—IC ₅₀ (μM)							
	ABCB1		ABCC1		ABCG2		OATP Cellular Assays	
ritonavir	8.4	0.3	7.7	-	8.3	7.5	2.3	1.4
remdesivir	-	>20	-	*	>50	>50	3.8	3.8
remdesivir-SBECD	-	>20	-	NA	>50	>50	6.1	5.6
favipiravir	-	-	-	-	-	-	-	-

* Stimulation of substrate transport.

4. Discussion

Multispecific drug and xenobiotic transporters play a major role in the pharmacokinetics of numerous pharmacological agents, and any new drug candidates have to be tested for interactions with the key transporters in this regard [66,67]. However, several drugs rapidly repurposed in the past months for potential anti-COVID-19 activity may not have been analyzed in detail for these interactions. This lack of information is making their clinical use, especially in combination with other pharmacological agents, potentially dangerous for patients. Since SARS-CoV-2 virus infection causes severe clinical symptoms, especially in elderly patients and/or in those with existing co-morbidities, the ADME-Tox properties and the potentially harmful drug–drug interactions of the repurposed drugs may have major relevance in these cases. In addition, there are no current methods for correctly estimating the transporter–drug interactions by *in silico* approaches, and only detailed *in vitro* studies may answer these questions. Therefore, in the present study, we examined the interactions of the repurposed drug candidates with the key multispecific drug transporters, with the hope that our results help clinical applications in COVID-19 treatment. We have used a wide range of assay systems and transported substrates to provide comparative aspects for the transporter–drug interactions.

ABC transporters play a key role in the pharmacokinetics of numerous pharmacological agents, and they—especially ABCB1 and ABCG2—should be tested in early phases of drug development [66]. As shown in the results section and in the summary in Table 2, regarding the three ABC multispecific transporters examined, we found that chloroquine, hydroxychloroquine, and favipiravir displayed practically no potentially relevant interaction with any of these transporters. In contrast, ivermectin was found to exert a strong inhibitory effect in the case of the ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporter. Some of these interactions have already been explored; in particular, ivermectin inhibition of the human and animal Mdr1/Pgp/ABCB1 has been studied in detail [8,9,68]. As we show here, in all kinds of assays, a strong inhibition of both ABCC1 and ABCG2 transport activity was also observed by ivermectin, emphasizing the potentially dangerous effects of this compound at higher doses or with an impaired transporter function. The antiviral protease inhibitors lopinavir and ritonavir had a significant inhibitory effect on the three ABC transporters examined here, and a strong inhibition was observed for ABCB1/Pgp (Table 2). However, ABCC1 and ABCG2 were also inhibited by these compounds in potentially relevant concentrations. As suggested by the relevant FDA information (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/021226s018lbl.pdf, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/kaleta-epar-scientific-discussion_en.pdf), lopinavir in patients may reach plasma concentrations of about 13 μM, while ritonavir may peak at about 1 μM. Therefore, our *in vitro* data indicate that drug–drug interactions should be considered. Remdesivir was found to be a relatively weak inhibitor of all three ABC transporters, although the ABCB1/Pgp inhibition with an IC₅₀ of about 20 μM, which was observed in the vesicular transport assay, may be relevant under certain treatment conditions (reported peak plasma concentrations of remdesivir of about 5 μM). Interestingly, remdesivir significantly stimulated the vesicular transport of a test substrate ETGB by the ABCC1 transporter, so an allosteric effect of remdesivir on this transporter should be considered.

The experiments performed in intact cells expressing the polymorphic ABCG2 transporter variant Q141K, with impaired membrane localization and transport activity, suggest that, with lower transporter functions, some of the weak inhibitors may have a clinically important effect. In this case, both lopinavir and ritonavir exerted significantly stronger inhibition of this drug transporter variant. Considering that the allele encoding the ABCG2-Q141K variant (rs2231142) has an incidence of about 30% in the Asian population, this information is especially important for clinical interventions in these countries. In our studies, we also examined the membrane ATPase activity of the ABCB1 and ABCG2 transporters in isolated membranes. These assays may help to decipher the substrate vs. inhibitor nature of the test compounds. Although these results only provide a tentative answer in this regard, we found that the ABCB1-ATPase activity is significantly stimulated by low concentrations of lopinavir, ritonavir, and remdesivir, indicating that these drugs may be transported substrates. We observed no such stimulation in the case of the ABCG2 transporter in terms of these drugs. In addition to the ABC multidrug transporters, the role of drug-transporting OATPs in pharmacokinetics and drug–drug or food–drug interactions is increasingly being recognized [66]. While OATPs 1B1 and 1B3 are liver-specific proteins, OATP1A2 and OATP2B1 are highly expressed in the endothelial cells of the BBB. Therefore, these transporters are key modulators of the entry of their drug substrates into the central nervous system [41,69,70]. In addition, OATP2B1 also influences the absorption of its substrates from the intestine [40]. In the current study, we investigated the interactions between OATP1A2 and OATP2B1 and drugs repurposed to treat COVID-19 disease. We found high-affinity interactions between the antiviral protease inhibitors lopinavir and ritonavir with both OATP1A2 and OATP2B1. These interactions have already been documented [71–74]. Moreover, lopinavir and ritonavir are also inhibitors of OATP1B1 and OATP1B3, which are the key transporters in the liver [71]. The IC₅₀ values obtained in our study are in harmony with those observed by Tupova et al. [72] and Kis et al. [73]. Moreover, a previous study [74] showed that lopinavir is transported by OATP1A2, so OATP1A2 probably affects lopinavir absorption and blood to brain entry. Ivermectin, as reported previously [75], also inhibited OATP2B1, although in our experiments, with a higher affinity than that found by Karlgren et al. (20 µM, 39%—this may be explained by the different test substrates used). However, here, we document, for the first time, that ivermectin inhibits OATP1A2 function. Our experiments confirmed the relatively weak interactions between chloroquine and hydroxychloroquine with OATP1A2 and OATP2B1, and the observed IC₅₀ values are in harmony with those found by others [76,77]. We observed no interaction of favipiravir with the two OATPs examined here. There are no data available for the interaction of remdesivir—currently a major anti-COVID-19 drug candidate—with OATP1A2 and OATP2B1. Based on our data, showing a high-affinity interaction of remdesivir with both transporters, and the relatively high plasma concentrations of this drug (peak values in 3–5 µM [78,79]), remdesivir may significantly interfere with the pharmacokinetics of drug substrates of OATP1A2 and OATP2B1. Our current methods do not distinguish between transported and non-transported inhibitors, so further investigations are needed to decipher whether OATP1A2 and OATP2B1 can mediate the uptake of remdesivir. From the currently developed anti-COVID-19 drugs tested in our study, favipiravir is the most promising candidate for avoiding unexpected drug–drug interactions. Favipiravir, similar to what was found for the multispecific ABC transporters located in the tissue barriers (see above), did not inhibit the function of the investigated OATPs. Therefore, this compound is not expected to influence OATP-mediated drug pharmacokinetics. As a summary, our current data, summarized in Table 2, provide a detailed *in vitro* quantitative analysis on the interaction of the anti-COVID-19 agents with the key human multispecific drug transporters. These *in vitro* assays, which should be followed by careful clinical pharmacokinetic studies, may provide a strong warning against the compassionate use of some of these agents, especially when other relevant drugs are also applied to the patient, or in cases of endogenously impaired transporter activity.

Author Contributions: Á.T., C.Ö.-L., and B.S. wrote the draft, and C.A., O.M., E.S., É.B., Á.T., and G.V. performed the experiments and critically revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been supported by research grants from the National Research, Development and Innovation Office (OTKA, grant numbers FK 128751 (C.-Ö.L.), K-128011 (G.V.), KFI_16-1-2017-0232 (Á.T.), FIEK 16-1-2016-0005, and VEKOP-2.1.1-15-2016-00117 (B.S.)). O.M. was supported by the KDP doctoral scholarship from the Ministry for Innovation and Technology (National Research, Development and Innovation Fund).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author at the Researchgate website (https://www.researchgate.net/profile/Csilla_Ozvegy-Laczka, or https://www.researchgate.net/publication/347138768_Interactions_of_anti-COVID-19_drug_candidates_with_multispecific_ABC_and_OATP_drug_transporters). The data are not publicly available due to a company participation.

Acknowledgments: The 5D3 antibody was a kind gift from B. Sorrentino, St. Jude Children Hospital, Memphis, USA, and remdesivir and remdesivir-SBECd were kind gifts from Lajos Szente, Cyclolab Ltd., Budapest, Hungary.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: An old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722–727. [[CrossRef](#)]
2. Singh, H.; Chauhan, P.; Kakkar, A.K. Hydroxychloroquine for the treatment and prophylaxis of COVID-19: The journey so far and the road ahead. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, 173717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Vincent, M.J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B.R.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Seidah, N.G.; Nichol, S.T. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology* **2005**, *2*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Liu, J.; Cao, R.; Xu, M.; Wang, X.; Zhang, H.; Hu, H.; Li, Y.; Hu, Z.; Zhong, W.; Wang, M. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wang, M.; Cao, R.; Zhang, L.; Yang, X.; Liu, J.; Xu, M.; Shi, Z.; Hu, Z.; Zhong, W.; Xiao, G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **2020**, *30*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Simpson, T.F.; Kovacs, R.J.; Stecker, E.C. *Cardiology Magazine*. Available online: <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/article/s/2020/03/27/14/00/ventricular-arrhythmia-risk-due-to-hydroxychloroquine-azithromycin-treatment-for-covid-19> (accessed on 20 November 2020).
7. Roden, D.M.; Harrington, R.A.; Poppas, A.; Russo, A.M. Considerations for Drug Interactions on QTc in Exploratory COVID-19 Treatment. *Circulation* **2020**, *141*, e906–e907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Schinkel, A.H.; Smit, J.J.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.; van der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, E.C.; te Riele, H.P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **1994**, *77*, 491–502. [[CrossRef](#)]
9. Mealey, K.L.; Bentjen, S.A.; Gay, J.M.; Cantor, G.H. Ivermectin sensitivity in colliers is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* **2001**, *11*, 727–733. [[CrossRef](#)]
10. Lespine, A.; Dupuy, J.; Orłowski, S.; Nagy, T.; Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Alvinerie, M. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *159*, 169–179. [[CrossRef](#)]
11. Pouliot, J.F.; L'Heureux, F.; Liu, Z.; Prichard, R.K.; Georges, E. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 17–25. [[CrossRef](#)]
12. Didier, A.; Loor, F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer. Drugs* **1996**, *7*, 745–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wagstaff, K.; Sivakumaran, H.; Heaton, S.; Harrich, D.; Jans, D. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and Dengue virus. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 851–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lundberg, L.; Pinkham, C.; Baer, A.; Amaya, M.; Narayanan, A.; Wagstaff, K.M.; Jans, D.A.; Kehn-Hall, K. Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. *Antivir. Res.* **2013**, *100*, 662–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yang, S.N.Y.; Atkinson, S.C.; Wang, C.; Lee, A.; Bogoyevitch, M.A.; Borg, N.A.; Jans, D.A. The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β heterodimer. *Antivir. Res.* **2020**, *177*, 104760. [[CrossRef](#)]

16. Bray, M.; Rayner, C.; Noël, F.; Jans, D.; Wagstaff, K. Ivermectin and COVID-19: A report in Antiviral Research, widespread interest, an FDA warning, two letters to the editor and the authors' responses. *Antivir. Res.* **2020**, *178*, 104805. [[CrossRef](#)]
17. Caly, L.; Druce, J.D.; Catton, M.G.; Jans, D.A.; Wagstaff, K.M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antivir. Res.* **2020**, *178*, 104787. [[CrossRef](#)]
18. Chaccour, C.; Hammann, F.; Ramón-García, S.; Rabinovich, N.R. Ivermectin and COVID-19: Keeping Rigor in Times of Urgency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *102*, 1156–1157. [[CrossRef](#)]
19. Uzunova, K.; Filipova, E.; Pavlova, V.; Vekov, T. Insights into antiviral mechanisms of remdesivir, lopinavir/ritonavir and chloroquine/hydroxychloroquine affecting the new SARS-CoV-2. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110668. [[CrossRef](#)]
20. Arshad, U.; Pertinez, H.; Box, H.; Tatham, L.; Rajoli, R.K.R.; Curley, P.; Neary, M.; Sharp, J.; Liptrott, N.J.; Valentijn, A.; et al. Prioritization of Anti-SARS-Cov-2 Drug Repurposing Opportunities Based on Plasma and Target Site Concentrations Derived from their Established Human Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2020**, *108*, 775–790. [[CrossRef](#)]
21. Weiss, J.; Rose, J.; Storch, C.H.; Ketabi-Kiyanvash, N.; Sauer, A.; Haefeli, W.E.; Efferth, T. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 238–245. [[CrossRef](#)]
22. Martinec, O.; Huliciak, M.; Staud, F.; Cecka, F.; Vokral, I.; Cervený, L. Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Corona, G.; Vaccher, E.; Sandron, S.; Sartor, I.; Tirelli, U.; Innocenti, F.; Toffoli, G. Lopinavir-ritonavir dramatically affects the pharmacokinetics of irinotecan in HIV patients with Kaposi's sarcoma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 601–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Agarwal, S.; Pal, D.; Mitra, A.K. Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. *Int. J. Pharm.* **2007**, *339*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Janneh, O.; Jones, E.; Chandler, B.; Owen, A.; Khoo, S.H. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 987–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gupta, A.; Zhang, Y.; Unadkat, J.D.; Mao, Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 334–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bierman, W.F.W.; Scheffer, G.L.; Schoonderwoerd, A.; Jansen, G.; van Agtmael, M.A.; Danner, S.A.; Scheper, R.J. Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1672–1680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yoon, J.-J.; Toots, M.; Lee, S.; Lee, M.-E.; Ludeke, B.; Luczo, J.M.; Ganti, K.; Cox, R.M.; Sticher, Z.M.; Edpuganti, V.; et al. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*. [[CrossRef](#)]
29. Furuta, Y.; Komeno, T.; Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2017**, *93*, 449–463. [[CrossRef](#)]
30. Yang, K. What Do We Know About Remdesivir Drug Interactions? *Clin. Transl. Sci.* **2020**, *13*, 842–844. [[CrossRef](#)]
31. Szakács, G.; Váradi, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 379–393. [[CrossRef](#)]
32. Takada, T.; Ichida, K.; Matsuo, H.; Nakayama, A.; Murakami, K.; Yamanashi, Y.; Kasuga, H.; Shinomiya, N.; Suzuki, H. ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2014**, *33*, 275–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.* **2006**, *1179*–1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dauchy, S.; Dutheil, F.; Weaver, R.J.; Chassoux, F.; Daumas-Duport, C.; Couraud, P.-O.; Scherrmann, J.-M.; De Waziers, I.; Declèves, X. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: Expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1518–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kamiie, J.; Ohtsuki, S.; Iwase, R.; Ohmine, K.; Katsukura, Y.; Yanai, K.; Sekine, Y.; Uchida, Y.; Ito, S.; Terasaki, T. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1469–1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Uchida, Y.; Ohtsuki, S.; Katsukura, Y.; Ikeda, C.; Suzuki, T.; Kamiie, J.; Terasaki, T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 333–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Daood, M.; Tsai, C.; Ahdab-Barmada, M.; Watchko, J.F. ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS. *Neuropediatrics* **2008**, *39*, 211–218. [[CrossRef](#)]
38. Hagenbuch, B.; Gui, C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* **2008**, *38*, 778–801. [[CrossRef](#)]
39. Hagenbuch, B.; Stieger, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 396–412. [[CrossRef](#)]
40. Shitara, Y.; Maeda, K.; Ikejiri, K.; Yoshida, K.; Horie, T.; Sugiyama, Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: Their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm. Drug Dispos.* **2013**, *34*, 45–78. [[CrossRef](#)]

41. Urquhart, B.L.; Kim, R.B. Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 1063–1070. [[CrossRef](#)]
42. Yu, J.; Zhou, Z.; Tay-Sontheimer, J.; Levy, R.H.; Ragueneau-Majlessi, I. Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 2312–2325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kovacsics, D.; Patik, I.; Özvegy-Laczka, C. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2017**, *13*, 409–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Szabó, E.; Türk, D.; Telbisz, Á.; Kucsma, N.; Horváth, T.; Szakács, G.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Várady, G. A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zámbo, B.; Móznér, O.; Bartos, Z.; Török, G.; Várady, G.; Telbisz, Á.; Homolya, L.; Orbán, T.I.; Sarkadi, B. Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 365–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sarkadi, B.; Bauzon, D.; Huckle, W.R.; Earp, H.S.; Berry, A.; Suchindran, H.; Price, E.M.; Olson, J.C.; Boucher, R.C.; Scarborough, G.A. Biochemical characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2087–2095. [[CrossRef](#)]
47. Patik, I.; Székely, V.; Német, O.; Szepesi, Á.; Kucsma, N.; Várady, G.; Szakács, G.; Bakos, É.; Özvegy-Laczka, C. Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ozvegy, C.; Litman, T.; Szakács, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 111–117. [[CrossRef](#)]
49. Telbisz, A.; Müller, M.; Ozvegy-Laczka, C.; Homolya, L.; Szenté, L.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2698–2713. [[CrossRef](#)]
50. Ozvegy, C.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47980–47990. [[CrossRef](#)]
51. Bakos, É.; Német, O.; Patik, I.; Kucsma, N.; Várady, G.; Szakács, G.; Özvegy-Laczka, C. A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2. *FEBS J.* **2020**, *287*, 2468–2485. [[CrossRef](#)]
52. Székely, V.; Patik, I.; Ungvári, O.; Telbisz, Á.; Szakács, G.; Bakos, É.; Özvegy-Laczka, C. Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2020**, *151*, 105395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Homolya, L.; Holló, Z.; Müller, M.; Mechetner, E.B.; Sarkadi, B. A new method for quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 849–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hooiveld, G.J.E.J.; Heegsma, J.; van Montfoort, J.E.; Jansen, P.L.M.; Meijer, D.K.F.; Müller, M. Stereoselective transport of hydrophilic quaternary drugs by human MDR1 and rat Mdr1b P-glycoproteins. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 1685–1694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Herédi-Szabó, K.; Palm, J.E.; Andersson, T.B.; Pál, Á.; Méhn, D.; Fekete, Z.; Beéry, E.; Jakab, K.T.; Jani, M.; Krajcsi, P. A P-gp vesicular transport inhibition assay—optimization and validation for drug-drug interaction testing. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 773–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Holló, Z.; Homolya, L.; Hegedűs, T.; Müller, M.; Szakács, G.; Jakab, K.; Antal, F.; Sarkadi, B. Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 2981–2987. [[PubMed](#)]
57. Slot, A.J.; Wise, D.D.; Deeley, R.G.; Monks, T.J.; Cole, S.P.C. Modulation of human multidrug resistance protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP2 (ABCC2) transport activities by endogenous and exogenous glutathione-conjugated catechol metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 552–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Strouse, J.J.; Ivnitiski-Steele, I.; Waller, A.; Young, S.M.; Perez, D.; Evangelisti, A.M.; Ursu, O.; Bologna, C.G.; Carter, M.B.; Salas, V.M.; et al. Fluorescent substrates for flow cytometric evaluation of efflux inhibition in ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters. *Anal. Biochem.* **2013**, *437*, 77–87. [[CrossRef](#)]
59. Telford, W.G.; Bradford, J.; Godfrey, W.; Robey, R.W.; Bates, S.E. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1029–1036. [[CrossRef](#)]
60. Boesch, M.; Reimer, D.; Rumpold, H.; Zeimet, A.G.; Sopper, S.; Wolf, D. DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein. *Cytom. A* **2012**, *81*, 517–522. [[CrossRef](#)]
61. Nerada, Z.; Hegyi, Z.; Szepesi, Á.; Tóth, S.; Hegedűs, C.; Várady, G.; Matula, Z.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Telbisz, Á. Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytom. A* **2016**, *89*, 826–834. [[CrossRef](#)]
62. Zong, Y.; Zhou, S.; Fatima, S.; Sorrentino, B.P. Expression of mouse *Abcg2* mRNA during hematopoiesis is regulated by alternative use of multiple leader exons and promoters. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29625–29632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zhou, S.; Schuetz, J.D.; Bunting, K.D.; Colapietro, A.M.; Sampath, J.; Morris, J.J.; Lagutina, I.; Grosveld, G.C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; et al. The ABC transporter *Bcrp1/ABCG2* is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1028–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Sjöstedt, N.; van den Heuvel, J.J.M.W.; Koenderink, J.B.; Kidron, H. Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1626–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Móznér, O.; Bartos, Z.; Zámbo, B.; Homolya, L.; Hegedűs, T.; Sarkadi, B. Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism. *Cells* **2019**, *8*, 1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Giacomini, K.M.; Balimane, P.V.; Cho, S.K.; Eadon, M.; Edeki, T.; Hillgren, K.M.; Huang, S.-M.; Sugiyama, Y.; Weitz, D.; Wen, Y.; et al. International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 23–26. [[CrossRef](#)]
67. Huang, S.-M.; Zhang, L.; Giacomini, K.M. The International Transporter Consortium: A collaborative group of scientists from academia, industry, and the FDA. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 32–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Geyer, J.; Gavrilova, O.; Petzinger, E. Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*-deficient knockout mice. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2009**, *32*, 87–96. [[CrossRef](#)]
69. Gao, B.; Hagenbuch, B.; Kullak-Ublick, G.A.; Benke, D.; Aguzzi, A.; Meier, P.J. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 73–79.
70. Billington, S.; Salphati, L.; Hop, C.E.C.A.; Chu, X.; Evers, R.; Burdette, D.; Rowbottom, C.; Lai, Y.; Xiao, G.; Humphreys, W.G.; et al. Interindividual and Regional Variability in Drug Transporter Abundance at the Human Blood-Brain Barrier Measured by Quantitative Targeted Proteomics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *106*, 228–237. [[CrossRef](#)]
71. Annaert, P.; Ye, Z.W.; Stieger, B.; Augustijns, P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* **2010**, *40*, 163–176. [[CrossRef](#)]
72. Tupova, L.; Hirschmugl, B.; Sucha, S.; Pilarova, V.; Székely, V.; Bakos, É.; Novakova, L.; Özvegy-Laczka, C.; Wadsack, C.; Ceckova, M. Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kis, O.; Zastre, J.A.; Ramaswamy, M.; Bendayan, R. pH dependence of organic anion-transporting polypeptide 2B1 in Caco-2 cells: Potential role in antiretroviral drug oral bioavailability and drug-drug interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 1009–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Hartkoorn, R.C.; Kwan, W.S.; Shallcross, V.; Chaikan, A.; Liptrott, N.; Egan, D.; Sora, E.S.; James, C.E.; Gibbons, S.; Bray, P.G.; et al. HIV protease inhibitors are substrates for OATP1A2, OATP1B1 and OATP1B3 and lopinavir plasma concentrations are influenced by SLCO1B1 polymorphisms. *Pharmacogenet. Genom.* **2010**, *20*, 112–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Karlgren, M.; Vildhede, A.; Norinder, U.; Wisniewski, J.R.; Kimoto, E.; Lai, Y.; Haglund, U.; Artursson, P. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): Influence of protein expression on drug-drug interactions. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4740–4763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hubeny, A.; Keiser, M.; Oswald, S.; Jedlitschky, G.; Kroemer, H.K.; Siegmund, W.; Grube, M. Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2 in Red Blood Cells and Its Potential Impact on Antimalarial Therapy. *Drug Metab. Dispos.* **2016**, *44*, 1562–1568. [[CrossRef](#)]
77. Xu, C.; Zhu, L.; Chan, T.; Lu, X.; Shen, W.; Madigan, M.C.; Gillies, M.C.; Zhou, F. Chloroquine and Hydroxychloroquine Are Novel Inhibitors of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 884–890. [[CrossRef](#)]
78. Cao, Y.-C.; Deng, Q.-X.; Dai, S.-X. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: An evaluation of the evidence. *Travel Med. Infect. Dis.* **2020**, *35*, 101647. [[CrossRef](#)]
79. Jorgensen, S.C.J.; Kebriaei, R.; Dresser, L.D. Remdesivir: Review of Pharmacology, Pre-clinical Data, and Emerging Clinical Experience for COVID-19. *Pharmacotherapy* **2020**, *40*, 659–671. [[CrossRef](#)]



OPEN

Interactions of anti-COVID-19 drug candidates with hepatic transporters may cause liver toxicity and affect pharmacokinetics

Csilla Ambrus^{1,3,5}, Éva Bakos^{2,5}, Balázs Sarkadi^{2,4}, Csilla Özvegy-Laczka² & Ágnes Telbisz²✉

Transporters in the human liver play a major role in the clearance of endo- and xenobiotics. Apical (canalicular) transporters extrude compounds to the bile, while basolateral hepatocyte transporters promote the uptake of, or expel, various compounds from/into the venous blood stream. In the present work we have examined the in vitro interactions of some key repurposed drugs advocated to treat COVID-19 (lopinavir, ritonavir, ivermectin, remdesivir and favipiravir), with the key drug transporters of hepatocytes. These transporters included ABCB11/BSEP, ABCC2/MRP2, and SLC47A1/MATE1 in the canalicular membrane, as well as ABCC3/MRP3, ABCC4/MRP4, SLC22A1/OCT1, SLCO1B1/OATP1B1, SLCO1B3/OATP1B3, and SLC10A1/NTCP, residing in the basolateral membrane. Lopinavir and ritonavir in low micromolar concentrations inhibited BSEP and MATE1 exporters, as well as OATP1B1/1B3 uptake transporters. Ritonavir had a similar inhibitory pattern, also inhibiting OCT1. Remdesivir strongly inhibited MRP4, OATP1B1/1B3, MATE1 and OCT1. Favipiravir had no significant effect on any of these transporters. Since both general drug metabolism and drug-induced liver toxicity are strongly dependent on the functioning of these transporters, the various interactions reported here may have important clinical relevance in the drug treatment of this viral disease and the existing co-morbidities.

COVID-19 is a devastating new viral disease still showing an overall fatality rate of about 2–3%, with numerous patients requiring intensive care treatment. Several repurposed drugs have been proposed to have therapeutic effects against Sars-CoV-2 both in vitro and in vivo, and currently the most widely studied and applied such agents include ivermectin (IVE), ritonavir (RIT), lopinavir (LOP), favipiravir (FAV) and remdesivir (REM)^{1–9}. IVE is a frequently used anti-parasitic drug, especially effective in various tropical diseases. While IVE has also been indicated to inhibit the cellular replication of the SARS-CoV-2 virus¹, clinical trials showed no convincing antiviral efficacy in this disease^{10,11}. LOP and RIT are efficient HIV protease inhibitors and were also shown to have in vitro efficacy against SARS-CoV-2 replication^{6,12}. However, clinical studies performed until now do not support their anti-COVID-19 efficiency, neither when applied separately, nor in a combination, named Kaletra⁵. Currently none of these compounds are promoted to be used in COVID-19 outside selected clinical trials¹³. FAV and REM are prodrugs invented earlier as antivirals, inhibiting viral RNA-dependent RNA polymerase. Currently these two drugs have emergency use authorization for COVID-19 treatment in several countries, with still ongoing clinical studies. Remdesivir can be applied in hospitals only, whereas favipiravir can be prescribed at earlier disease stages for non-hospitalized patients as well. Currently the usefulness of these therapies is questionable, although slight beneficial effects are probable¹⁴.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics, as well as toxic side effects of pharmaceutical agents are greatly influenced by membrane transporters, especially by those expressed in tissue barriers and in the central organ for drug metabolism, the liver (see Fig. 1). Canalicular ABC (ATP Binding Cassette) transporters in

¹SOLVO Biotechnology, Irinyi József street 4-20, 1117 Budapest, Hungary. ²Institute of Enzymology, ELKH Research Centre for Natural Sciences, Magyar Tudósok krt. 2, 1117 Budapest, Hungary. ³Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, Tűzoltó u. 37-47, 1094 Budapest, Hungary. ⁴Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Tűzoltó u. 37-47, 1094 Budapest, Hungary. ⁵These authors contributed equally: Csilla Ambrus and Éva Bakos. ✉email: telbisz.agnes@ttk.hu

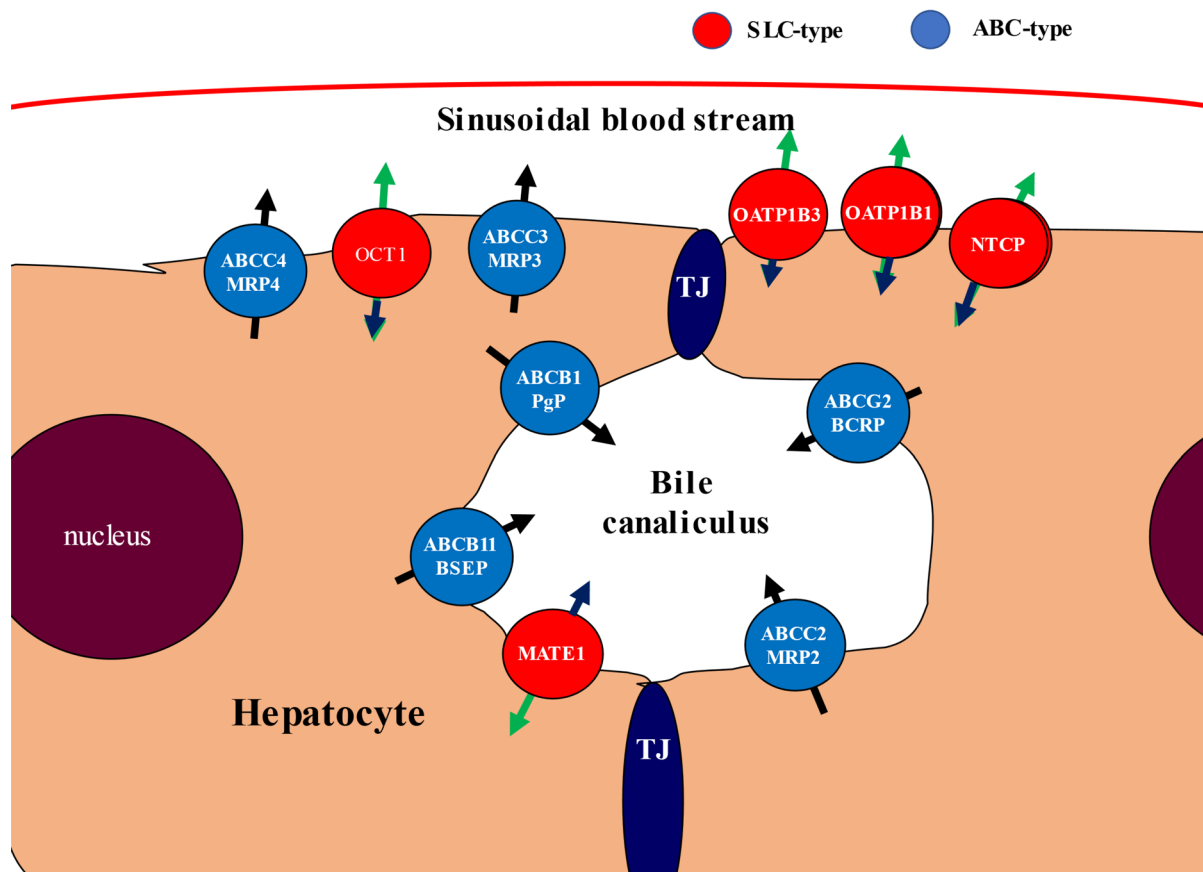


Figure 1. Schematic presentation of the localization and transport directions of the hepatocyte transporters examined in the present work. SLC type transporters are colored red, ABC type transporters are blue, TJ: tight junction.

hepatocytes, such as ABCC2/MRP2, ABCG2/BCRP, ABCB1/MDR1/ P-gp and ABCB11/BSEP (bile salt export pump) mediate the extrusion of endo- and xenobiotics into the bile. P-gp, MRP2 and ABCG2 are multispecific transporters mediating the efflux of hydrophobic (P-gp) or partially detoxified amphiphilic compounds (MRP2, ABCG2). MRP2 is the key transporter for bilirubin conjugates. The SLC-type transporter MATE1 (SLC47A1—multidrug and toxin extrusion protein 1) in the hepatocyte canalicular membrane mainly transports cationic drugs, but also some zwitterionic and anionic molecules^{15,16}, and mediates their biliary excretion. Inhibition of these drug exporters may cause elevated liver toxicity due to compound accumulation. ABCB11 (bile salt export pump, BSEP), the pump responsible for the extrusion of bile salts into the canaliculi, may also be inhibited by numerous drugs, leading to cholestasis or drug-induced liver injury (DILI)¹⁷.

Basolateral/sinusoidal ABC transporters (ABCC3/MRP3 and ABCC4/MRP4) defend the hepatocytes from any potential overaccumulation of toxic agents, including drugs, by their extrusion into the venous blood^{18–23}. Key SLC-type (“uptake”) drug transporters from the sinusoidal blood stream include SLC22A1/OCT1, SLC10A1/NTCP, SLC01B1/OATP1B1 and SLC01B3/OATP1B3. OCT1 preferentially supports the hepatocellular entry of cationic agents, thus working in a coordinated fashion with the apical MATE1. NTCP primarily performs sodium-dependent uptake of bile acids in the basolateral membrane of hepatocytes, thus NTCP, together with BSEP, are major players in the enterohepatic circulation of bile acids. However, NTCP also promotes the hepatocyte uptake of several drugs, including statins, and therefore is a recognized risk factor for hepatic drug–drug interactions^{24–26}. OATP1B1 and OATP1B3 are the key organic anion uptake transporters in the liver. Although with somewhat different selectivities and specificities, these transporters are responsible for the hepatocellular uptake and elimination of a wide variety of drugs and toxic compounds from the blood stream. Inhibition of these transporters causes an increase in blood retention and general toxicity of many clinically applied agents^{27–30}.

While the transporter-related pharmacology and toxicology properties of LOP, RIT and IVE have already been examined in several studies, there are no detailed data available for REM and FAV. Previously we have studied the interactions of these repurposed anti-COVID-19 drugs with tissue barrier membrane transporters³¹, while in the current work, using various *in vitro* assays, we have examined their interactions with the key hepatocellular transporters involved in hepatic drug clearance. Based on the data obtained, we also provide assessment of *in vivo* pharmacokinetic properties and potential drug–drug interactions for these compounds.

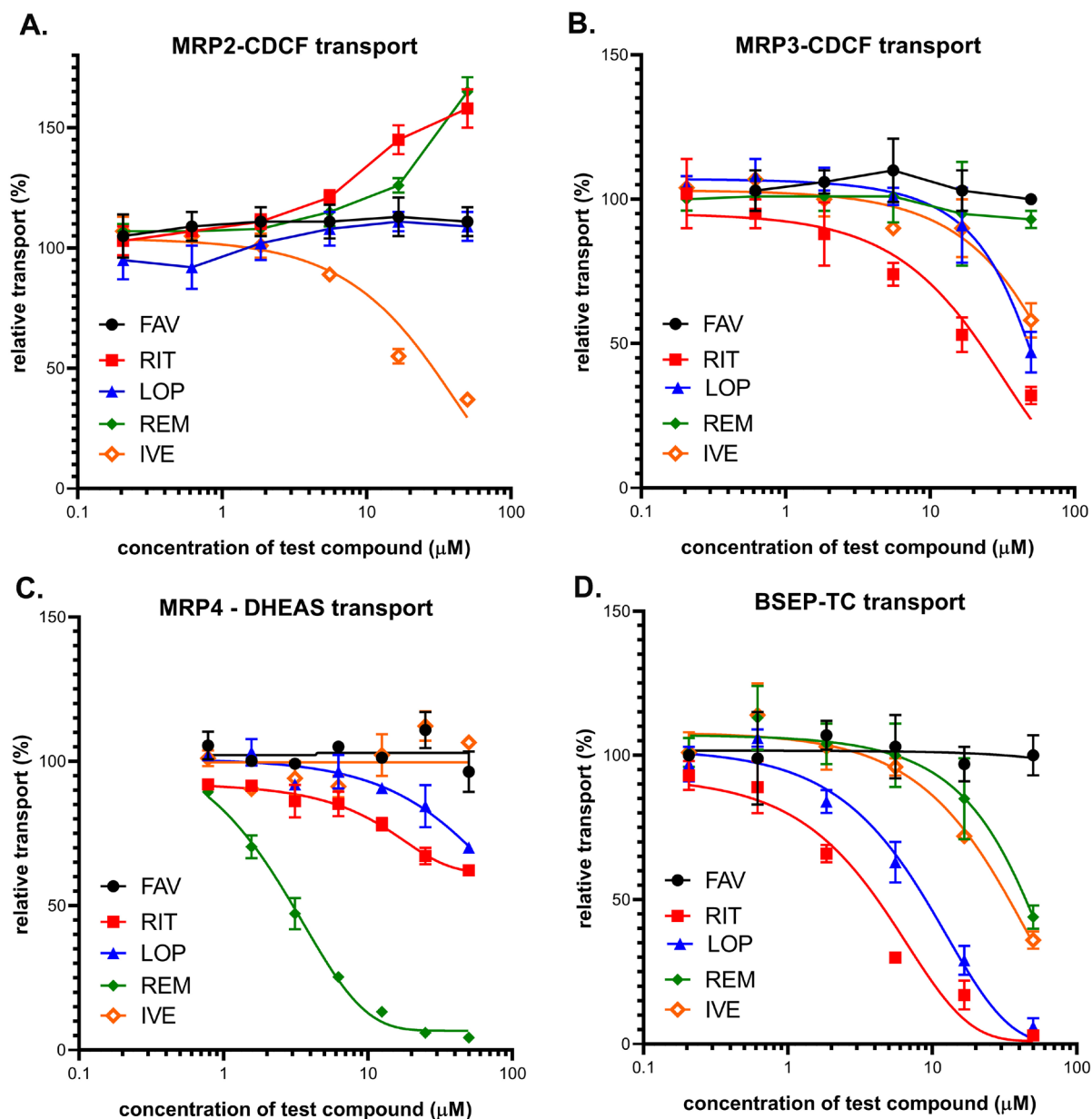


Figure 2. Inhibition of vesicular uptake of transporter-specific substrates by FAV, RIT, LOP, REM and IVE. (A) Inhibition of ATP-dependent vesicular uptake of CDCF in Sf9 cell membrane vesicles overexpressing MRP2. 30 μg (protein content) membrane vesicle was incubated with 5 μM CDCF at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown. (B) Inhibition of ATP- and benzbromarone sensitive CDCF uptake into inverted HEK cell membrane vesicles overexpressing MRP3. 30 μg membrane vesicle was incubated with 5 μM CDCF at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown. (C) Inhibition of ATP- dependent DHEAS uptake into inverted HEK cell membrane vesicles overexpressing MRP4. 50 μg membrane vesicle was incubated with 0.5 μM DHEAS at 32 $^{\circ}\text{C}$ for 1.5 min. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown. (D) Inhibition of ATP- and glyburide-sensitive taurocholate (TC) uptake into inverted HEK cell membrane vesicles, overexpressing BSEP. 50 μg membrane vesicle was incubated with 2 μM TC at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown.

Results

Interaction of potential anti-COVID-19 drugs with hepatic ABC transporters. MRP2 drug interactions were characterized by following the inhibitory effects of drugs on ATP- and benzbromarone-sensitive CDCF uptake into inverted membrane vesicles generated from MRP2-overexpressing Sf9 cells (Fig. 2A and Table 1). We found that IVE strongly decreased the accumulation of the probe substrate at higher than 10 μM concentration, while LOP and FAV had no such effect. Interestingly, RIT and REM did not inhibit but rather increased the probe substrate transport at high concentrations, possibly due to an allosteric effect^{32,33}. Since reduced glutathione (GSH) levels may affect MRP2-dependent substrate transport or drug interactions, we have

Table 1/A: Effects of drugs on hepatocyte exporters (basolateral: MRP3 and MRP4, apical: BSEP, MRP2 and MATE1)										
Hepatocyte exporters	ABCC3/MRP3		ABCC4/MRP4		ABCB11/BSEP		ABCC2/MRP2		MATE1/SLC47A1	
	Type	IC ₅₀ μM	Type	IC ₅₀ μM	Type	IC ₅₀ μM	Type	IC ₅₀ μM	Type	IC ₅₀ μM
LOP	inh	>40	No effect	–	inh	7.8	No effect	–	inh	7.7
RIT	inh	17	No effect	–	inh	3.2	Increase	–	inh	1.4
IVE	inh	>50	No effect	–	inh	≥30	inh	≥20	No effect	–
REM	No effect	–	inh	2.9	inh	≥40	Increase	–	inh	2.3

Table 1/B: Effects of drugs on hepatocyte importers (uptake transporters)										
Hepatocyte importers	OATP1B1			OATP1B3			NTCP/SLC10A1		OCT1/SLC22A1	
	Type	IC ₅₀ μM	R value	Type	IC ₅₀ μM	R value	Type	IC ₅₀ μM	Type	IC ₅₀ μM
LOP	inh	1.1	2.39	inh	2.6	1.74	inh	≥50	inh	>50
RIT	inh	1.4		inh	1.5		inh	≥50	inh	5.9
IVE	inh	≥20		inh	1.4	1.07	no	–	no effect	–
REM	inh	2.9		inh	4.3		inh	≥50	inh	6.1

Table 1/C: Effects of drugs on the hepatocyte exporters ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP, as measured previously in similar vesicular transporter assay systems (Telbisz et al., 2021)										
Hepatocyte exporters	ABCB1/Pgp			ABCG2/BCRP						
	Type	IC ₅₀ μM	C _{max} /IC ₅₀	type	IC ₅₀ μM	C _{max} /IC ₅₀				
LOP	inh	0.6	18.6	inh	4.2	3.33				
RIT	inh	0.3	2.66	inh	7.5	0.13				
IVE	inh	0.3	0.17	inh	1.1	0.047				
REM	inh	>20	n.r	inh	>50	n.r				

Table 1. Summary of the transporter modulation properties of the repurposed anti-COVID-19 drugs examined in transport assays. Approximate IC₅₀ (μM) values were determined by nonlinear regression analysis of the data shown in the results section, using GraphPad prism software (version 5.01, GraphPad, La Jolla, CA, USA). Favipiravir (not listed) had no effect on any of the transporters examined. Estimation of the DDI effects was performed as described in the Methods section, and references for in vivo parameters were provided in the Discussion. For importers the R values (cut off value 1.1), while for the exporters C_{max}/IC₅₀ values (cut off value 0.1) were calculated. For lopinavir and ritonavir R values were calculated for a combined treatment.

also examined these transport processes in the presence of 2 mM GSH, but neither the vesicular uptake of CDCF, nor its inhibition by the drugs examined were affected (data not shown).

MRP3 drug interactions were characterized by measuring ATP- and benzbromarone sensitive CDCF uptake into inverted HEK-293 membrane vesicles generated from MRP3-overexpressing HEK-293 cells (Fig. 2B and Table 1). Only RIT inhibited the MRP3 transport function at a lower than 10 μM concentration, whereas LOP and IVE were effective only at higher concentrations (>20 μM), while FAV and REM did not influence MRP3 transport at all.

MRP4 drug interactions were characterized by measuring ATP-sensitive DHEAS (dehydroepiandrosterone-sulfate) uptake into inverted membrane vesicles generated from MRP4 overexpressing HEK-293 cells (Fig. 2C and Table 1). We found that most drugs examined had no significant inhibitory effect on MRP4-dependent substrate transport (a maximum of 10–30% inhibition was observed by up to 50 μM of RIT, LOP, IVE or FAV), while REM had a strong inhibitory action on this transporter, with an IC₅₀ of about 2.3 μM (Fig. 2C).

BSEP drug interactions were characterized here by measuring the effects of drugs on ATP- and glyburide sensitive taurocholate (TC) uptake into inverted cell membrane vesicles generated from BSEP overexpressing HEK-293 cells (Fig. 2D and Table 1). We found that LOP and RIT strongly inhibited TC transport at low concentrations (see Table 1 for IC₅₀ values) whereas IVE and REM were only effective above 20 μM. FAV did not modify BSEP-mediated TC transport.

Cellular assays for SLC type transporters. OATP1B1 (Fig. 3A) and OATP1B3 (Fig. 3B) drug inhibition was studied by measuring the uptake of the fluorescent model substrate, pyranine, into A431 cells overexpressing the respective transporters and into mock-transfected control cells. As shown on Fig. 3, the drug inhibition panel for the two OATPs examined was somewhat different: IVE was less inhibitory for OATP1B1 than for OATP1B3, and RIT, LOP and REM had strong inhibitory effect at low micromolar range but with slightly different IC₅₀ values for both transporters (see Table 1). FAV did not modify OATP functionality in our assay.

MATE1 (SLC47A1) interaction was characterized by metformin uptake into MDCKII cells overexpressing MATE1 and in mock-transfected controls. As shown in Fig. 4A, LOP, RIT and REM had a strong inhibitory action on this transporter at the low micromolar range, while IVE and FAV showed practically no inhibition of MATE1 transport activity (see also Table 1).

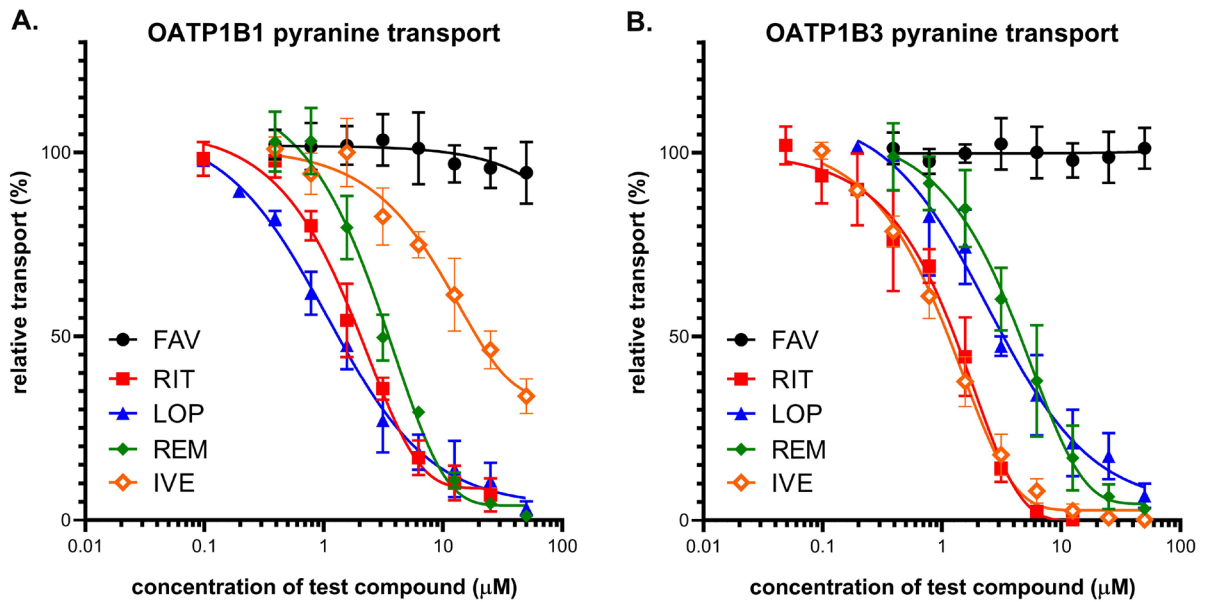


Figure 3. Inhibition of OATP1B1 (Panel A) and OATP1B3 (Panel B) dependent pyranine uptake in transporter overexpressing A431 cells by repurposed anti-COVID agents. Cells were incubated with 10 μM (OATP1B1) or 20 μM (OATP1B3) pyranine in the presence or absence of increasing concentrations of anti-COVID agents at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 or 30 min (OATP1B1 or OATP1B3, respectively). Average values of 3 independent experiments \pm SD are shown.

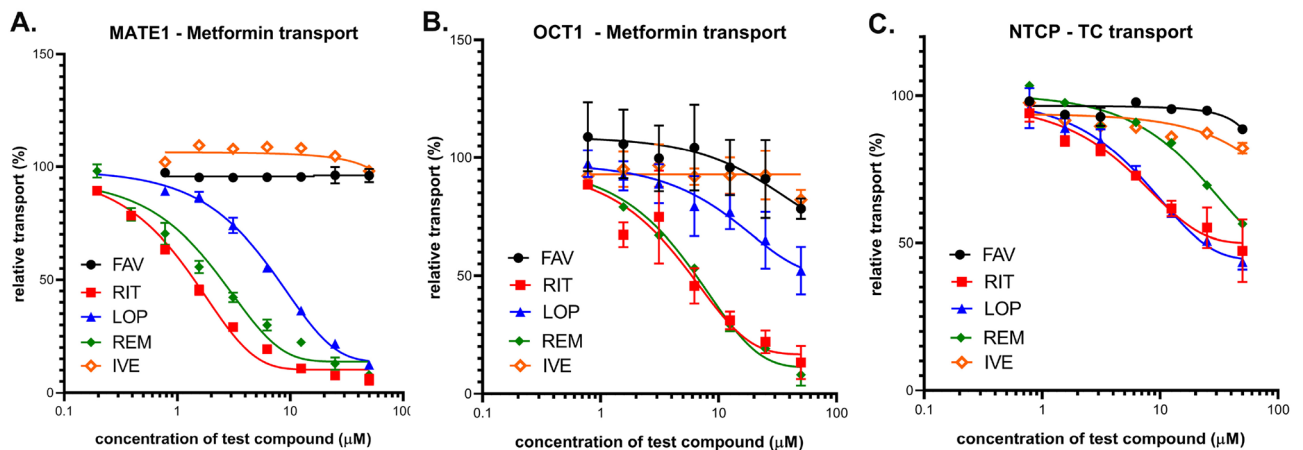


Figure 4. Inhibition of the cellular uptake of transporter-specific substrates by the repurposed anti-COVID agents FAV, RIT, LOP, REM and IVE. (A) Inhibition of MATE1 dependent metformin uptake in MATE1-overexpressing MDCKII cells. Uptake was measured by 10 μM metformin for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown. (B) Inhibition of OCT1-dependent metformin uptake in OCT1-overexpressing HEK cells. Uptake was measured by 10 μM metformin for 5 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown. (C) Inhibition of NTCP-dependent taurocholate uptake in NTCP-overexpressing HEK cells. Uptake was measured by 2 μM taurocholate for 2 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Average values of 3 independent experiments \pm SE are shown.

OCT1 (SLC22A1) interaction was measured by metformin uptake into HEK-293 cells overexpressing OCT1 and mock-transfected controls. As shown in Fig. 4B, RIT and REM had a strong inhibitory effect on this transporter (below 10 μM), while LOP was less inhibitory, and IVE and FAV had no significant inhibitory action on OCT1 transport (see also Table 1).

NTCP/SLC10A1 interaction was investigated in HEK-293 cells overexpressing NTCP, where taurocholate (TC) uptake was measured in NTCP-overexpressing and in mock-transfected control cells. As shown in Fig. 4C, the repurposed anti-COVID agents had relatively weak inhibitory action on this uptake transporter: RIT, LOP and REM had IC_{50} values at or above 50 μM , and IVE and FAV showed only minor inhibition, and observed only at higher concentrations.

Discussion

In the present work we have studied transporter interactions of several repurposed potential anti-COVID-19 agents. We focused on key membrane transporters involved in the liver uptake and excretion of endo- and xenobiotics and applied well documented *in vitro* assay techniques to characterize these interactions. We selected lopinavir, ritonavir, ivermectin, remdesivir and favipiravir as promising repurposed anti-COVID-19 agents for these studies. Some of the data presented here reinforces previously described transporter-drug interactions. In addition, our study on the key hepatocyte transporters working in a network at the uptake and export sites, may help decipher both potential risks of drug-induced liver injury (DILI) and alterations in general hepatocellular functions. Importantly, in the case of the clinically most promising agents, remdesivir and favipiravir, our findings may serve as a valuable addition to the previously scarce information about transporter interaction of these drugs.

In the case of ABC transporters, we employed a vesicular transport assay system based on inside-out vesicles generated of membrane isolates in which modulatory effects of the drugs on the accumulation of model substrates could be quantitatively examined. For SLC-type transporters we used whole-cell assays, in which drug modulation of a transporter specific substrate uptake was measured. In order to provide an estimation of potential *in vivo* drug effects from *in vitro* data, we followed the recommendations of the International Transporter Consortium (ITC)³⁴ and used the available pharmacokinetic data for the given compounds, to indicate potential drug-drug interaction risks (DDI)³⁴. We used the recommended *in vivo*—*in vitro* extrapolation approach, based on the R values for OATP transporters and the C_{max}/IC_{50} values for ABC transporters (see the Methods section). In this extrapolation, our IC_{50} values and the FDA-published pharmacokinetic data for these drugs were used.

In harmony with earlier investigations, our results show that IVE has a strong *in vitro* inhibitory effect on ABCB1, ABCG2 and OATP1B3 transporters^(13,35–37, Table 1). According to the FDA guideline for ivermectin (IVE), we calculated the possible drug influence using a 165 µg/kg IVE dose and a peak plasma concentration value of 46 ng/ml (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050742s022lbl.pdf). The predicted R value for IVE in the case of OATP1B3 (1.07) is near to the 1.1 cut-off value, and the C_{max}/IC_{50} value is above the 0.1 cut-off value for ABCB1 (0.17) but not for ABCG2 (0.047). These data suggest that higher dose IVE treatment may increase the risk of DDI related to the interactions with these transporters. As widely accepted, mainly the ABCB1/P-gp and the ABCG2/BCRP efflux transporters are responsible for reduced human IVE toxicity, by restricting the absorption of this drug in the intestine and protecting the brain as part of the blood–brain barrier^{35,36,38,39}. Based on our results, MRP2 and BSEP inhibition appears only at higher IVE concentrations (above 20 µM), which probably does not occur *in vivo*, but compromised ABCB1 and ABCG2 transporter function (mutations, inhibition) may increase available drug plasma levels.

LOP and IVE were suggested to be used in combination (Kaletra) for antiviral treatment⁵. It has been reported that these drugs strongly inhibited several drug transporters in a wide array of *in vitro* assays^{17,37,40–45}, and here we have also found that LOP and RIT inhibited several hepatic transporters with high affinity (IC_{50} -s below 10 µM, see³¹ and Table 1). According to an FDA dataset for Kaletra, the potential treatment dose is 400 mg lopinavir and 100 mg ritonavir, added in combination as an antiviral treatment (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021251s046_021906s039lbl.pdf). This dose results in about 11–20 µM of lopinavir and 1–1.73 µM of ritonavir peak plasma concentrations *in vivo*⁴⁶. The estimated R values for OATP1B1 (2.39, combined) and OATP1B3 (1.74, combined), and the C_{max}/IC_{50} values for ABCB1 (18.6 for LOP, 2.66 for RIT) and ABCG2 (3.33 for LOP, 0.13 for RIT) indicate that LOP and RIT may exceed the cut-off values of these transporters and thus, inhibition of these transporters can be a relevant factor in DDI risk. Though the RIT dosage is relatively low in Kaletra, the measured low IC_{50} values indicate that RIT may exacerbate lopinavir-mediated transporter inhibition in the combination treatment.

Estimation of clinical relevance from the *in vitro* inhibition data regarding the other investigated transporters is more difficult. However, the low *in vitro* IC_{50} values (Table 1) for the OCT1 and the MATE1 transporters raise the possibility of potentially compromised *in vivo* function of these transporters. Previously, RIT was classified as a highly potential DILI causing compound, based on information in the NIH LiverTox Database⁴⁷ (livertox.nih.gov) and the Liver Toxicity Knowledge Base (fd.gov), although the cause of the observed liver enzyme elevations during ritonavir therapy has not yet been fully understood. The risk of DILI by RIT and LOP may occur via several mechanisms. It is known that these drugs are extensively metabolized via CYP3A4, and the production of toxic intermediates as well as their interactions with multidrug transporters may be involved in liver toxicity. Another significant source of DILI can be a compromised bile acid handling. If hepatocellular concentrations of these drugs reach the micromolar range, the bile acid exporter activity of BSEP may be decreased, because the IC_{50} values of LOP and RIT regarding BSEP were 7.8 and 3.2 µM, respectively. Indeed, even low potency BSEP inhibition may be biologically significant if the local drug exposure is high. It has been reported that basolateral MRP3 and MRP4 provide a compensatory mechanism for bile acid efflux in the case of BSEP inhibition⁴⁸ and, although these transporters also interact with RIT and LOP, the high IC_{50} values indicate that RIT and LOP may not inhibit the function of these transporters *in vivo*. However, the combined inhibition of BSEP and these transporters may lead to a clinically significant DILI, especially in the case of a wide-spread inflammation caused by a Sars-CoV-2 infection. In addition, pharmacokinetics of other drugs, optionally co-dosed in COVID patients, may be influenced by LOP/RIT. For example the transport of OATP1B substrate drugs, including statins, repaglinide, olmesartan and valsartan^{28,49,50}, or the OCT1- and MATE1-mediated metformin transport⁵¹ could also potentially be affected by LOP and/or RIT. Consistently with *in vitro* findings of transporter inhibition studies, Macias et al. found in a cross-sectional study a high overall frequency of DDI between ritonavir-boosted lopinavir for treating COVID-19 and other relevant medications such as statins, antibiotics, corticosteroids, or antiarrhythmic drugs⁵².

Since REM is a most promising repurposed drug in treating COVID-19, in this work we carefully assessed potential transporter inhibitions by this compound in various assay systems. REM did not show a significant inhibition of the ABC transporters, while we observed strong inhibition of OATP transporters (IC_{50} of OATP1B1

and 1B3 were 2.9 and 4.3 μM , respectively) (Table 1). Moreover, OCT1- and MATE1-mediated in vitro metformin transport was inhibited by REM in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 6.1 and 2.3 μM . These in vitro IC_{50} concentrations are close to the peak plasma concentration observed 30 min after intravenous administration of 200 mg REM for 30 min⁵³, or close to the 3.7 μM C_{max} after intravenous administration of a clinically applied dose of 100 mg remdesivir in healthy adults (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/214787Orig1s000lbl.pdf).

Based on our data, a combined inhibition of these transporters may affect the uptake and the biliary extrusion of both anionic and cationic drugs as well as endogenous substrates, such as bile acids. REM also inhibited the NTCP-mediated uptake of taurocholate in a concentration-dependent manner. As NTCP and BSEP inhibition in vitro occurred only at high REM concentrations (40–50% inhibition at 50 μM) probably not achieved in vivo, this effect may not be considered clinically relevant. REM was shown to inhibit MRP4 in vitro (IC_{50} was 2.9 μM), whereas it did not inhibit either MRP2 or MRP3. Since MRP4 has the ability to transport nucleoside analogue drugs^{21,54}, this relatively selective effect was not unexpected. Regarding MRP4, there are no specific citations of clinically relevant DDIs ascribed to this transporter, and there is only limited information on the role of MRP4 in the clinical ADME of drugs. However, MRP4 is a multispecific pump extruding endogenous metabolites, including bile acids, urate, and conjugated steroid hormones into the bile canaliculi, therefore its potential involvement in adverse effects and DDI cannot be excluded. When treating co-morbidities in COVID-19, clinically important MRP4 drug substrates include cephalosporin, several antibiotics, diuretics like furosemide and hydrochlorothiazide, as well as olmesartan^{18,21–23,54–58}. In addition, MRP4 inhibitors include non-steroidal anti-inflammatory and cardiovascular drugs⁵⁴. It should be noted that while in this work we focused on liver resident transporters, MATE1 and MRP4 are also highly expressed in the basolateral renal tubular membranes and these proteins have an important role in renal drug excretion. The current FDA guideline recommends evaluation of MATE1-mediated interactions for drugs that undergo significant renal secretion ($\geq 25\%$ of total systemic clearance). Thus, REM inhibition of MRP4 may have multiple effects on general uric acid and drug clearance. In addition, MRP4 in the intestinal epithelia is involved in the oral absorption of various drugs, while in the blood–brain barrier MRP4 has a protective role for the central nervous system from drugs^{20,57}.

In our REM studies, the data support earlier observations (https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/summary-compassionate-use-remdesivir-gilead_en.pdf) on the inhibition of OATP1B1, OATP1B3, BSEP, MRP4, and NTCP, while MATE1 inhibition is a new information. Since REM is rapidly cleared ($T_{1/2} = 69$ min)⁵³ from the human body, the potential of REM to be a perpetrator of clinically significant drug–drug interactions through these hepatic transporters is limited.

As a summary, we found that the examined repurposed anti-COVID-19 agents, with the exception of FAV, have multiple inhibitory effects on hepatic membrane transporters. These results may significantly help to decipher the effects of these transporter–drug interactions on general drug clearance and drug-induced liver toxicity. In addition, the various interactions quantitatively assessed here should be considered in clinical drug treatment strategies for the COVID-19 disease and for understanding existing co-morbidities.

Methods

The source of materials is provided in the detailed descriptions of the methods applied. Lopinavir, ritonavir and ivermectin were obtained from Sigma Aldrich Inc.; favipiravir (T-705) from MedChem Express; remdesivir was kindly provided by Lajos Szente, Cyclolab Ltd, Budapest, Hungary.

For the **ABC-type transporter assays** we used isolated membrane vesicle-based functional assays. ABCC2/MRP2 vesicles were prepared from Sf9 cells infected by the human MRP2 coding baculovirus using a previously established method³³. ABCB11/BSEP, ABCC3/MRP3 and ABCC4/MRP4 membranes were prepared from transporter expressing HEK-293 cells by Solvo Biotechnology (Budapest, Hungary). The vesicular uptake of transporter specific substrates was measured, and transporter related uptake was defined as the difference between the uptake with and without ATP (in the presence of AMP). Transporter specific inhibitors were also applied to control the specificity of transporters. For BSEP, radiolabeled taurocholate (1.5 μCi /sample of radiolabeled compound plus 2 μM unlabeled TC) (PerkinElmer Co); for MRP2 and MRP3, CDCF (5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, Sigma) (5 μM); for MRP4, radiolabeled dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) (0.2 μCi radiolabeled compound plus 0.5 μM unlabeled DHEAS) (PerkinElmer Co) substrates were used. Applied specific inhibitors were 100 μM glyburide for BSEP, 40 μM benzobromarone for MRP2 and MRP3, and 50 μM MK571 for MRP4. A 30 μg (MRP2, MRP3) or 50 μg (BSEP, MRP4) protein/sample was incubated for 10 or for 1.5 min (MRP4) with the specific substrate at 37 °C or at 32 °C (MRP4) in the presence of test drugs (added in 1 μl of DMSO) and incubation was started by pipetting 4 mM Mg-ATP or Mg-AMP to the samples. DMSO was added to the controls as well. The sample volume was 75 μl . After the incubation, samples were filtrated and washed rapidly on the Millipore manifold vacuum filter in MSFBN6B10 (Millipore, Burlington, MA, US) filter plate. After the plates were dried, Optiphase HiSafe (PerkinElmer) scintillation cocktail was added to each well for detection of radiolabeled compounds. CDCF was dissolved from the filter by 10% SDS and as a fluorescence stabilizer 0.1 N NaOH was added. The amount of radiolabeled substrates inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting by a MicroBeta Scintillation Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, US). CDCF fluorescence was measured by VictorX (PerkinElmer Perkin-Elmer, Waltham, MA, US) plate reader at 492/635 nm.

For the **SLC type transporter assays** we used whole cell assays, by employing cell lines specifically expressing the investigated hepatic transporters and the relevant control, mock-transfected cell lines⁵⁹.

For the **OATP1B1 and OATP1B3 transporter assays**, the interaction between potential anti-COVID-19 agents and OATPs was investigated in a microplate-based indirect assay employing pyranine as described⁶⁰. Briefly, A431 cells (ATCC) overexpressing OATPs⁶⁰ and mock transfected A431 cells as control were seeded on 96-well plates in a density of 8×10^4 cells/well and cultured for 24 h at 37 °C. The next day, cell culture media was

removed and the cells were preincubated in an uptake buffer in the presence or absence of anti-COVID-19 agents for 5 min at 37 °C. The reaction was started by the addition of an uptake buffer containing a final concentration of 10 μM (OATP1B1) or 20 μM (OATP1B3) pyranine and cells were incubated at 37 °C for 15 min (OATP1B1) or 30 min (OATP1B3). The reaction was stopped by removing the supernatant and the cells were washed with ice-cold PBS. The fluorescence of cells was determined using an Enspire fluorescent plate reader (PerkinElmer Co), Ex/Em: 460/510 nm. OATP-dependent transport was determined by extracting fluorescence measured in mock transfected cells.

MATE1 (SLC47A1), OCT1 (SLC22A1) and NTCP (SLC10A1) transporter inhibition assays were performed as follows: overexpressing cell lines created by lentiviral method were used for these assays described in⁶¹. MATE1 was overexpressed in Madin-Darby canine kidney strain II (MDCKII) cells while OCT1 and NTCP were overexpressed in HEK-293 cells. Cells were seeded into 96-well tissue culture plates at a cell density of 1×10^5 cells per well. Experiments were performed 16–24 h after seeding. Before the experiments, cells were pre-incubated at 37 °C for 5 min in a Krebs Henseleit buffer (KHB, pH 8.0) or Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.4) containing the tested drug at increasing concentration. DMSO was used for solvent control and the reference inhibitor (RI) for reference inhibitor wells. After the pre-incubation step, the solutions were removed. Experiments were performed at 37 °C in KHB or in HBSS containing the appropriate probe substrate and the drug at increasing concentrations. The organic solvent concentrations were equal in all wells. Cells overexpressing MATE1 and OCT1 were incubated with metformin (10 μM, including 0.2 or 0.1 μCi/mL ¹⁴C-metformin) for 10 or 5 min, respectively, while cells overexpressing NTCP were incubated with TC (2 μM, including 2 μCi/mL ³H-TC) for 2 min at 37 °C. MDCKII or HEK293-Mock (empty vector transduced) cells were used as a control. After the experiment, cells were washed twice with 100 μL of cold HBSS and lysed with 50 μL of 0.1 M NaOH and then analyzed by liquid scintillation.

Data and statistical analysis. All experiments were performed in duplicates and repeated in three biological replicates, thus each data point reflects six independent measurements. The group sizes were equal in all experiments. Normalization for the per cent (%) of control values was performed after subtracting the background levels as specified in the assay descriptions above, in order to avoid the inherent differences of the transporter activities and to properly reflect the inhibitory potential of each drug examined. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis using the GraphPad prism software (version 5.01, GraphPad, La Jolla, CA, US <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

For the estimation of potential in vivo drug effects, we have used the R values and the C_{max}/IC₅₀ values, calculated as described in the International Transporter Consortium guideline³⁴, and the available pharmacokinetic data for the compounds. The R value is defined as $1 + (f_u \times I_{in, max} / IC_{50})$, in which I_{in, max} is the estimated maximum inhibitor concentration at the inlet to the liver and is equal to: $I_{in, max} = C_{max} + (k_a \times Dose \times FaFg) / Qh / RB$, where C_{max} is the maximum systemic plasma concentration of the inhibitor; k_a is the absorption rate constant. k_a = 0.1/min was used as the worst-case estimate; Fa is the fraction absorbed, and Fa = 1 was used as the worst-case estimate. Fg is the intestinal availability, and Fg = 1 was used as the worst-case estimate; Qh is the hepatic blood flow rate. Qh = 1,500 ml/min was used; RB is the blood-to-plasma concentration ratio, assumed to be 1. IC₅₀ is the drug concentration which caused in vitro measured half maximum inhibition of the given transporter.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 1 April 2021; Accepted: 22 July 2021

Published online: 08 September 2021

References

1. Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A. & Wagstaff, K. M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res.* **178**, 104787. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787> (2020).
2. Guzzo, C. A. *et al.* Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **42**, 1122–1133. <https://doi.org/10.1177/009127002401382731> (2002).
3. DiNicolantonio, J. J., Barroso, J. & McCarty, M. Ivermectin may be a clinically useful anti-inflammatory agent for late-stage COVID-19. *Open Heart.* <https://doi.org/10.1136/openhrt-2020-001350> (2020).
4. Sanders, J. M., Monogue, M. L., Jodlowski, T. Z. & Cutrell, J. B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review. *JAMA* **323**, 1824–1836. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019> (2020).
5. Cao, B. *et al.* A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1787–1799. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001282> (2020).
6. Choy, K. T. *et al.* Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* **178**, 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786> (2020).
7. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **30**, 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0> (2020).
8. Beigel, J. H. *et al.* Remdesivir for the treatment of Covid-19—Final report. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1813–1826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764> (2020).
9. Goldman, J. D. *et al.* Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1827–1837. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015301> (2020).
10. Camprubi, D. *et al.* Lack of efficacy of standard doses of ivermectin in severe COVID-19 patients. *PLoS ONE* **15**, e0242184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242184> (2020).

11. Chaccour, C. *et al.* The effect of early treatment with ivermectin on viral load, symptoms and humoral response in patients with non-severe COVID-19: A pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *EClinicalMedicine* **32**, 100720. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100720> (2021).
12. Kang, C. K. *et al.* In vitro activity of lopinavir/ritonavir and hydroxychloroquine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 at concentrations achievable by usual doses. *Korean J. Intern. Med.* **35**, 782–787. <https://doi.org/10.3904/kjim.2020.157> (2020).
13. Pan, H. *et al.* Repurposed antiviral drugs for Covid-19—Interim WHO solidarity trial results. *N. Engl. J. Med.* **384**, 497–511. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023184> (2021).
14. Heustess, A. M., Allard, M. A., Thompson, D. K. & Fasino, P. S. Clinical management of COVID-19: A review of pharmacological treatment options. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/ph14060520> (2021).
15. Koepsell, H. Organic cation transporters in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **72**, 253–319. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015578> (2020).
16. Yonezawa, A. & Inui, K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1817–1825. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01394.x> (2011).
17. Pedersen, J. M. *et al.* Early identification of clinically relevant drug interactions with the human bile salt export pump (BSEP/ABCB11). *Toxicol. Sci.* **136**, 328–343. <https://doi.org/10.1093/toxsci/ktf197> (2013).
18. de Waart, D. R. *et al.* Oral availability of cefadroxil depends on ABCC3 and ABCC4. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 515–521. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.041731> (2012).
19. Zelcer, N. *et al.* Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J. Hepatol.* **44**, 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.022> (2006).
20. Kanamitsu, K., Kusuhara, H., Schuetz, J. D., Takeuchi, K. & Sugiyama, Y. Investigation of the importance of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4) in the active efflux of anionic drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2566–2575. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.040> (2017).
21. Reid, G. *et al.* Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1094–1103. <https://doi.org/10.1124/mol.63.5.1094> (2003).
22. Ritter, C. A. *et al.* Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab. Rev.* **37**, 253–278. <https://doi.org/10.1081/dmr-200047984> (2005).
23. Russel, F. G., Koenderink, J. B. & Masereeuw, R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.01.006> (2008).
24. Doring, B., Lutteke, T., Geyer, J. & Petzinger, E. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr. Top. Membr.* **70**, 105–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1> (2012).
25. Ho, R. H. *et al.* Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* **130**, 1793–1806. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.034> (2006).
26. Jamei, M. *et al.* A mechanistic framework for in vitro-in vivo extrapolation of liver membrane transporters: prediction of drug-drug interaction between rosuvastatin and cyclosporine. *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 73–87. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0097-y> (2014).
27. Kovacsics, D., Patik, I. & Ozvegy-Laczka, C. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **13**, 409–424. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1253679> (2017).
28. Maeda, K. Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 155–168. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00767> (2015).
29. Schulte, R. R. & Ho, R. H. Organic anion transporting polypeptides: emerging roles in cancer pharmacology. *Mol. Pharmacol.* **95**, 490–506. <https://doi.org/10.1124/mol.118.114314> (2019).
30. Garrison, D. A., Talebi, Z., Eisenmann, E. D., Sparreboom, A. & Baker, S. D. Role of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions mediated by tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutics* <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090856> (2020).
31. Telbisz, A. *et al.* Interactions of potential anti-COVID-19 compounds with multispecific ABC and OATP drug transporters. *Pharmaceutics* <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010081> (2021).
32. Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K. & Poolman, B. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. *FEBS Lett.* **580**, 1085–1093. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.039> (2006).
33. Bodo, A., Bakos, E., Szeri, F., Varadi, A. & Sarkadi, B. Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions. *J. Biol. Chem.* **278**, 23529–23537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303515200> (2003).
34. International Transporter C *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028> (2010).
35. Schinkel, A. H. *et al.* Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491–502. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90212-7) (1994).
36. Jani, M. *et al.* Ivermectin interacts with human ABCG2. *J. Pharm. Sci.* **100**, 94–97. <https://doi.org/10.1002/jps.22262> (2011).
37. Lespine, A. *et al.* Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem. Biol. Interact.* **159**, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.11.002> (2006).
38. Pouliot, J. F., L'Heureux, F., Liu, Z., Prichard, R. K. & Georges, E. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 17–25. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(96\)00656-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(96)00656-9) (1997).
39. Didier, A. & Loor, F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* **7**, 745–751. <https://doi.org/10.1097/00001813-199609000-00005> (1996).
40. Agarwal, S., Pal, D. & Mitra, A. K. Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. *Int. J. Pharm.* **339**, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.036> (2007).
41. Annaert, P., Ye, Z. W., Stieger, B. & Augustijns, P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* **40**, 163–176. <https://doi.org/10.3109/00498250903509375> (2010).
42. Cvetkovic, M., Leake, B., Fromm, M. F., Wilkinson, G. R. & Kim, R. B. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 866–871 (1999).
43. Gupta, A., Zhang, Y., Unadkat, J. D. & Mao, Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 334–341. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065342> (2004).
44. Huisman, M. T. *et al.* Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS (London, England)* **16**, 2295–2301. <https://doi.org/10.1097/00002030-200211220-00009> (2002).
45. Perloff, M. D., Von Moltke, L. L., Marchand, J. E. & Greenblatt, D. J. Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. *J. Pharm. Sci.* **90**, 1829–1837. <https://doi.org/10.1002/jps.1133> (2001).
46. Batteux, B. *et al.* Abnormal laboratory findings and plasma concentration monitoring of lopinavir and ritonavir in COVID-19. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **87**, 1547–1553. <https://doi.org/10.1111/bcp.14489> (2021).
47. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012). PMID: 31643176, Bookshelf ID: NBK547852

48. Köck, K. *et al.* Risk factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 665–674. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054304> (2014).
49. Niemi, M. *et al.* Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **77**, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.01.018> (2005).
50. Kalliokoski, A. & Niemi, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 693–705. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x> (2009).
51. Liang, X. & Giacomini, K. M. Transporters involved in metformin pharmacokinetics and treatment response. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2245–2250. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.078> (2017).
52. Macías, J. *et al.* High rate of major drug-drug interactions of lopinavir-ritonavir for COVID-19 treatment. *Sci. Rep.* **10**, 20958. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78029-3> (2020).
53. Jorgensen, S. C. J., Kebriaei, R. & Dresser, L. D. Remdesivir: review of pharmacology, pre-clinical data, and emerging clinical experience for COVID-19. *Pharmacotherapy* **40**, 659–671. <https://doi.org/10.1002/phar.2429> (2020).
54. Wen, J. *et al.* The pharmacological and physiological role of multidrug-resistant protein 4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **354**, 358–375. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225656> (2015).
55. Zhao, X. *et al.* Involvement of human and canine MRP1 and MRP4 in benzylpenicillin transport. *PLoS ONE* **14**, e0225702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225702> (2019).
56. Zhou, S. F. *et al.* Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1981–2039. <https://doi.org/10.2174/092986708785132870> (2008).
57. Furmanski, B. D. *et al.* Contribution of ABCG4-mediated gastric transport to the absorption and efficacy of dasatinib. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4359–4370. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0980> (2013).
58. Kiser, J. J. *et al.* The effect of lopinavir/ritonavir on the renal clearance of tenofovir in HIV-infected patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 265–272. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100269> (2008).
59. Patik, I. *et al.* Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Sci. Rep.* **8**, 2630. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20815-1> (2018).
60. Szekeley, V. *et al.* Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *Eur. J. Pharm. Sci.* **151**, 105395. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105395> (2020).
61. Tatrai, P. *et al.* A systematic in vitro investigation of the inhibitor preincubation effect on multiple classes of clinically relevant transporters. *Drug Metab. Dispos.* **47**, 768–778. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.085993> (2019).

Web sites:

62. COVID-19 Treatment Guidelines. Information On COVID-19 Treatment, Prevention And Research. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>.
63. U.S. Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#major> (2017).
64. Data for Stromecol (IVE): https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050742s022lbl.pdf
65. Data for Kaletra. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021251s046_021906s039lbl.pdf
66. Data for REM: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/summary-compassionate-use-remdesivir-gilead_en.pdf; https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/214787Orig1s000lbl.pdf

Acknowledgements

This work has been supported by research grants from the National Research, Development and Innovation Office, by Grant Numbers FK 128751 (C.-Ö.L.), KFI_16-1-2017-0232 (Á.T.), FIEK 16-1-2016-0005, and VEKOP-2.1.1-15-2016-00117 (B.S.).

Author contribution

Participated in research design (Cs.A., É.B., Cs. Ö.-L., Á.T., B.S.), conducted experiments (Cs.A., É.B., Á.T.), performed data analysis (Cs.A., É.B., Á.T.), wrote or contributed to the writing manuscript (Cs. Ö.-L., B.S.)

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to Á.T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



Article

A Unique In Vitro Assay to Investigate ABCB4 Transport Function

Csilla Temesszentandrás-Ambrus ^{1,2} , Gábor Nagy ¹, Annamária Bui ¹ and Zsuzsanna Gáborik ^{1,*}¹ SOLVO Biotechnology, Charles River Laboratories Hungary, H-1117 Budapest, Hungary² Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, Tűzoltó u. 37-47, H-1094 Budapest, Hungary

* Correspondence: zsuzsanna.gaborik@crl.com; Tel.: +36-303879216

Abstract: ABCB4 is almost exclusively expressed in the liver, where it plays an essential role in bile formation by transporting phospholipids into the bile. ABCB4 polymorphisms and deficiencies in humans are associated with a wide spectrum of hepatobiliary disorders, attesting to its crucial physiological function. Inhibition of ABCB4 by drugs may lead to cholestasis and drug-induced liver injury (DILI), although compared with other drug transporters, there are only a few identified substrates and inhibitors of ABCB4. Since ABCB4 shares up to 76% identity and 86% similarity in the amino acid sequence with ABCB1, also known to have common drug substrates and inhibitors, we aimed to develop an ABCB4 expressing Abcb1-knockout MDCKII cell line for transcellular transport assays. This in vitro system allows the screening of ABCB4-specific drug substrates and inhibitors independently of ABCB1 activity. Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 cells constitute a reproducible, conclusive, and easy to use assay to study drug interactions with digoxin as a substrate. Screening a set of drugs with different DILI outcomes proved that this assay is applicable to test ABCB4 inhibitory potency. Our results are consistent with prior findings concerning hepatotoxicity causality and provide new insights for identifying drugs as potential ABCB4 inhibitors and substrates.

Keywords: ABCB4 inhibitors; MDR3; hepatotoxicity; drug-induced liver injury



Citation: Temesszentandrás-Ambrus, C.; Nagy, G.; Bui, A.; Gáborik, Z. A Unique In Vitro Assay to Investigate ABCB4 Transport Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4459. <https://doi.org/10.3390/ijms24054459>

Academic Editor: Giuliano Ciarimboli

Received: 13 January 2023

Revised: 20 February 2023

Accepted: 22 February 2023

Published: 24 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Multidrug resistance protein 3 (MDR3, ABCB4) is predominantly expressed in the canalicular membrane of hepatocytes. It has been predicted to be a floppase that translocates phosphatidylcholine (PC) from the inner to the outer leaflet of the membrane bilayer [1–3]. Translocated PCs are available for extraction by bile salts mixed micelles, and exert two essential functions in the bile: they protect the biliary tree from the detergent activity of bile salts [4,5], and maintain cholesterol solubility, preventing supersaturation with cholesterol [6].

In agreement with these proposed roles, ABCB4 mutations result in a broad spectrum of phenotypes ranging from progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3) to ABCB4-related cholestatic liver disorders of varying manifestation and severity in adults [7]. Clinical studies revealed the strong association between ABCB4 gene mutations and low-phospholipid-associated cholelithiasis syndrome (LPAC), a rare type of gallstone disease [8,9].

Historically, ABCB4 was classified as multidrug resistance transport protein based on 76% identity and 86% similarity of its amino acid sequence to the highly promiscuous ABCB1 transporter [10]. In a recent publication on cryo-EM studies with chimeric transporters of ABCB1 and ABCB4, a shared overall transport mechanism has been proposed. It suggests that ABCB4 transports PC to the outer membrane leaflet by an alternative access mechanism with the entire phospholipid molecule entering and leaving a central translocation pathway, in contrast to mechanisms proposed for other phospholipid transporters [11]. However, the loss of ABCB4 function is not readily compensated by ABCB1

or by other mechanisms [12]. In mouse knockout studies *Abcb1* is unable to compensate for loss of *Abcb4* function, as these mice develop a liver disease that appears to be caused by the complete inability of the liver to secrete phospholipids into the bile [5]. In a similar fashion, stable transfectants of LLC-PK1 cells revealed that ABCB1 has broad specificity for phospholipids, but ABCB4 expressing cells exclusively released short chain phosphatidylcholine [13].

In contrast, ABCB4 can recognize and transport ABCB1 substrates, but its role in conferring drug resistance is still inconclusive. Although the transport rate was low for most ABCB1 substrates, Smith et al. demonstrated directional transport of digoxin, paclitaxel, vinblastine and ivermectin through ABCB4-transfected LLC-PK1 cells. Digoxin transport was inhibited by typical ABCB1 inhibitors such as verapamil, cyclosporin A or valsopodar [5,13–16]. These results also suggest that ABCB4 is primarily a PC transporter that can translocate various typical ABCB1 substrates as well. Even though ABCB4 showed approximately 10-fold less ATPase activity than ABCB1, this activity is enough to confer multidrug resistance in chimera protein containing ABCB1 transmembrane domains [17]. The potential role of ABCB4 in multidrug resistance was indicated by increased ABCB4 transcript levels in paclitaxel-, doxorubicin-, and vincristine-resistant cell lines [18–20]. ABCB4 overexpression was also correlated with high-risk Wilms tumors [21].

Drug-induced liver injury (DILI) is a leading cause of drug development termination; therefore, its prediction in early stages is crucial [22,23]. Because of its role in the process of bile formation, inhibition of ABCB4 by drugs is believed to contribute to DILI and impact the hepatocellular/biliary toxicity of bile acids [24,25]. Drug-induced cholestasis (DIC), a frequent manifestation of DILI [26], is caused by alterations in the hepatobiliary disposition of bile acids, which in turn, is a result of direct injury to the bile ducts or inhibition of bile acid formation or transport [27,28]. Several drugs cause cholestasis by inhibiting canalicular efflux transporters [7,29]; however, there are significant differences in the relevance of biliary transporter inhibition in the development of DILI [30,31]. Inhibition of ABCB11 (Bile Salt Export Pump, BSEP) is a major risk factor in the development of cholestatic hepatotoxicity, though recent publications do not fully underscore this correlation [32,33]. To improve the predictive power, multidrug resistance proteins (MRPs) are included in screens with varying degrees of success [30,33,34]. In contrast to ABCB11, inhibition of ABCB4 in cholestatic diseases has received little attention to date.

Impaired ABCB4-mediated biliary phospholipid secretion was shown to be involved in itraconazole-induced cholestasis, where biliary PC levels were markedly reduced, while biliary bile salt levels remained unchanged [24]. While studying antifungal agents, Mahdi et al. described the inhibitory effect of ketoconazole and posaconazole in LLC-PK1-ABCB4 cells [35].

In a primary hepatocyte assay, ABCB4-mediated PC transport was investigated using several structurally distinct cholestatic drugs [25]. In a similar study, Aleo et al. tested 125 drugs grouped by their DILI potential, and identified several drugs which are shared inhibitors of both ABCB4 and ABCB11 [36]. These results suggest that such inhibitors may exacerbate the cholestatic effect [35].

Although *in vitro* ABCB4 assays have been already reported, only a few addressed the role of ABCB4 in drug interactions [25,36]. Hence, compared with other drug transporters, ABCB4 has a small number of identified drug substrates and inhibitors. Therefore, we aimed to investigate ABCB4 activity and interaction with drugs independently of other transporters in an *in vitro* assay.

Here, we developed an *Abcb1* knockout (*Abcb1*KO) MDCKII-ABCB4 cell line, which shows a polarized morphology and completely lacks *Abcb1* background activity but has ABCB4 activity. Using this cell line, the interaction of several hepatotoxic, anticancer as well as ABCB1 interactor drugs with ABCB4-mediated digoxin transport was investigated. We showed that this assay system is also well suited to identify potential drugs highly specific for ABCB4 by excluding overlapping specificity from *Abcb1*.

2. Results

2.1. Characterization of the *Abcb1* Knockout MDCKII Cell Line Engineered to Express ABCB4

An *Abcb1* biallelic knockout MDCKII (*Abcb1*KO-MDCKII) cell clone was generated by GenScript (Leiden, the Netherlands) using the CRISPR/Cas9 system. To verify biallelic KO, the canine *Abcb1*-related properties of the *Abcb1*KO-MDCKII and MDCKII parental cells were characterized. The transcript levels of *Abcb1* in the cell lines were analyzed by RT-qPCR (Figure S1a). The parental MDCKII and *Abcb1*KO-MDCKII cells were examined by FACS using a calcein AM assay. Compared with the MDCKII parental cells, the *Abcb1*KO-MDCKII cells exhibited a high fluorescent signal, corresponding to the lack of canine *Abcb1* efflux activity (Figure S1b).

To confirm the impact of endogenous canine *Abcb1* on the efflux ratio (ER) on two prototypic *Abcb1* substrates, bidirectional transport experiments with digoxin and talinolol (both 1 μ M) were performed. In the MDCKII parental cells, apparent permeability (P_{app}) in the B-A direction was higher than in the A-B direction, with an average ER of 4.74 ± 0.15 for digoxin and 2.70 ± 0.57 for talinolol, indicating active transport by canine *Abcb1*. In contrast, digoxin and talinolol P_{app} were identical in both directions in *Abcb1*KO-MDCKII cells, with an ER close to unity (Figure 1a). The *Abcb1* inhibitor valsopodar decreased the efflux ratios of both digoxin and talinolol close to unity in the MDCKII parental cells, whereas in the *Abcb1*KO-MDCKII cells the ER remained unaffected. In a previous study, using this *Abcb1*KO-MDCKII cell line, we also confirmed that maraviroc has a strong affinity for endogenous canine *Abcb1* in MDCKII cell lines, despite the lack of transport in the *Abcb1*KO-MDCKII cell line [37].

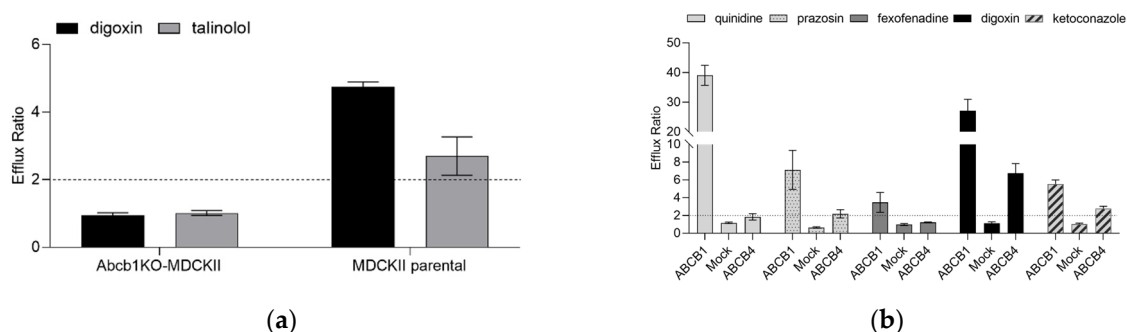


Figure 1. Efflux ratios for prototypic ABCB1 substrates. (a) Efflux ratios for digoxin and talinolol (1 μ M, traced with 0.17 μ Ci/mL 3 H-labelled probe) in the MDCKII parental and in the *Abcb1*KO cells. The dashed line indicates an efflux ratio of 2. Data are presented as mean \pm standard deviation for 3 experiments each performed in triplicate. (b) Functional characterization of ABCB1, Mock and ABCB4 cells using prototypical ABCB1 substrates (1 μ M, traced with 0.17 μ Ci/mL 3 H-labelled probe). The dashed line indicates an efflux ratio of 2. Data are presented as mean \pm standard deviation for 3 experiments each performed in triplicate.

For the purpose of this study, we expressed the ABCB4 protein in this *Abcb1*KO-MDCKII cell line. Expression of human ABCB4 mRNA were determined in the *Abcb1*KO-MDCKII-Mock and *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB4 cells by RT-qPCR (Figure S2). The ABCB4 mRNA level (determined by the formula $2^{-(\Delta\Delta CT)}$) was approximately 6000-fold higher in the *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB4 cells than in *Abcb1*KO-MDCKII-Mock cells. Canine *Abcb1* mRNA could not be detected in any of the cell lines.

Protein expression of human ABCB1 and ABCB4 were assessed by Western blot in the *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB4, *Abcb1*KO-MDCKII-Mock and previously established *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB1 cells (from now on referred as ABCB4, Mock and ABCB1 cells, respectively). Human ABCB1 protein was detected in the ABCB1 cells, but not in the ABCB4 cells, and ABCB4 was expressed only in the ABCB4 cell line. Neither ABCB1 nor ABCB4 was detectable in the Mock cells (Figure S3a,b).

2.2. Characterization of ABCB4 Transporter Function in the *Abcb1KO-MDCKII-ABCB4* Cell Line in Comparison with ABCB1 Function in *Abcb1KO-MDCKII-ABCB1* Cells

Since the substrate specificity of ABCB4 and ABCB1 was reported to be overlapping, we tested five known ABCB1 substrates (quinidine, prazosin, fexofenadine, digoxin, and ketoconazole at 1 μM final concentration) in bidirectional transport assays using ABCB1, Mock and ABCB4 cell lines (Figure 1b). While digoxin is a shared substrate for ABCB1 and ABCB4, it shows higher ER in the ABCB1-expressing cell line compared with ABCB4. The other compounds span a wide range of ERs (3.47 to 39) in the ABCB1-expressing cells. In contrast, quinidine and fexofenadine showed $\text{ER} < 2$ in the ABCB4 cells, which is a cut-off value for active efflux. In the case of prazosin, minor ABCB4-mediated directional transport was detected. Ketoconazole is an ABCB1 inhibitor [38] and an ABCB1 substrate [39]. Accordingly, an ER of 5.54 for ketoconazole was seen in the ABCB1 cell line. Under the experimental conditions of the present study, ketoconazole was also identified as an ABCB4 substrate (ER 2.78). The corresponding ERs in the control experiments using Mock cells were at, or very close to, unity.

For further functional validation of the assay, digoxin was used as an ABCB4 probe substrate. ABCB4-mediated digoxin transport experiments were conducted as a time course by taking samples from both compartments at various time points (1, 2, 3, 4 and 6 h). During the 6-h incubation, digoxin transport was roughly linear. Therefore, taking samples at one fixed time point should suffice for Papp calculations, and the 3 h time point was chosen for this (Figure S4a). The transepithelial transport of digoxin was measured for 3 h using a range of initial concentrations (Figure S4b,c); however, because of the low aqueous solubility and potentially higher K_m , the kinetic parameters of digoxin transport could not be determined.

2.3. Screening ABCB4 Interactors with Different DILI Concern to Test the Predictive Potential of the ABCB4 Transport Assay Using Digoxin

To investigate the predictive nature of the ABCB4 bidirectional assay in potential drug-ABCB4 interactions, inhibition studies were performed using 30 drugs with different DILI outcomes (18 Most-DILI concern, 9 Less-DILI concern and 3 No-DILI concern) from the U.S. Food and Drug Administration (FDA) Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB). In addition, seven structurally diverse compounds were also tested in ABCB4 inhibition assays. The concentration-dependent effect of the selected compounds on ABCB4-mediated digoxin (1 μM) transport were determined.

The known ABCB4 inhibitors itraconazole [24,25,35,40] and verapamil [16,25,36] showed potent inhibition of ABCB4 with estimated IC_{50} values of 0.17 and 0.39 μM , respectively. Ketoconazole (IC_{50} 0.56 μM), ritonavir (IC_{50} 0.73 μM), saquinavir (IC_{50} 1.4 μM) and valsopodar (IC_{50} 0.15 μM) also inhibited ABCB4-mediated digoxin transport. As shown in Table 1, fluconazole, amiodarone, carbamazepine, minoxidil, furosemide and acetylsalicylic acid have no effect on ABCB4-mediated transport of digoxin. The results are in agreement with the previous studies on hepatocytes [25,36]. We also identified ivermectin as an ABCB4 inhibitor in our assay, which is not surprising since it was described earlier that ABCB4 can bind and transport ivermectin in LLC-PK1-ABCB4 cells [16]. We did not detect interaction with methotrexate in our assay, in contrast to previous data [36]. In the case of benzbromarone, we observed the opposite phenomenon compared with other reported inhibitors. Instead of an IC_{50} value of 0.4 μM [36], a significantly higher IC_{50} value (19.89 μM) was determined in the ABCB4 cells.

Among drugs with Less-DILI-concern, the ABCB1 modulator amlodipine [41] showed a weak interaction with the ABCB4 protein. Fenofibrate, felodipine and pantoprazole showed no interaction with the ABCB4 transporter at the concentrations we tested, whereas carvedilol proved to be a potent inhibitor with an IC_{50} value of 0.70 μM .

Known ABCB1-interacting compounds were also investigated on the ABCB4 cells. We found that valsopodar [16] is a potent ABCB4 inhibitor as previously described, and zosuquidar, elacridar, mibefradil also elicited a strong concentration-dependent inhibitory

effect. Quinidine, a weak ABCB4 substrate, potently inhibited ABCB4 function with an IC_{50} value of 1.09 μ M. Prazosin also inhibited ABCB4 with an IC_{50} value of 16.12 μ M.

The tyrosine kinase inhibitors (TKIs) gefitinib, imatinib, sorafenib and erlotinib are classified as Most-DILI-concern drugs, and idelalisib can cause clinically apparent liver injury [42]. In our assay, the most potent ABCB4 inhibitors were gefitinib and imatinib (IC_{50} 0.81 and 1.24 μ M), whereas sorafenib and erlotinib showed less potent inhibition (IC_{50} 4.42 and $>5\mu$ M). Idelalisib did not inhibit ABCB4.

We also identified antiviral agents (lopinavir, darunavir and asunaprevir) as ABCB4 inhibitors, which has not previously been described in the literature. Representative inhibition curves are shown in Figure S5.

Table 1. Tested compounds with ABCB4 inhibition activities and with ABCB1 interaction abilities.

DILI Concern	Compound	IC_{50} (μ M), Based on Digoxin ER	In Vitro Literature Data (IC_{50} , μ M)	ABCB1 Interactor
Most DILI concern	gefitinib	0.81	a	Y [43]
	imatinib	1.24	a	Y [44]
	sorafenib	4.42	a	Y [45]
	erlotinib	$>5 \mu$ M, 60% inhibition at 5 μ M	a	Y [46]
	fluconazole	>3 , NI	>300 [36]	N [38]
	itraconazole	0.17	2.1 [25], 30% inhibition at 10 μ M [35], 50% inhibition at 1 μ M [24], 22.5 μ M [40]	Y [38]
	ketoconazole	0.56	5.6 [25], 4.6 [40]	Y [38]
	lopinavir	0.6	a	Y [47]
	ritonavir	0.73	9.6 [25], 11.3 [36]	Y [47]
	darunavir	$>10 \mu$ M, 60% inhibition at 10 μ M	a	Y [48]
	amiodarone	>10 , NI	>300 [36], >100 [40]	Y [49]
	benzbromarone	19.89	0.4 [36]	Y (in house data)
	carbamazepine	>80 , NI	>300 [36]	Conflicting information [50]
	clarithromycin	>80 , NI	a	Y [51]
	methotrexate	>10 , NI	3.1 [36]	Y [52]
	levofloxacin	>80 , NI	a	Y [53]
	diltiazem	48.61	a	Y [54]
cyclosporin A	0.46	>100 ^b [55], inhibitor ^d [16]	Y [56]	
Less DILI concern	saquinavir	1.4	12.9 [25]	Y [57]
	fenofibrate	>20 , NI	a	Y [58]
	ivermectin	0.53	Substrate [16]	Y [47]
	amlodipine	17.86	a	Y [41]
	pantoprazole	>10 , NI	a	Y [59]
	felodipine	>30 , NI	a	Y [60]
	carvedilol	0.70	a	Y [61]
	quinidine	1.09	a	Y [62]
	verapamil	0.39	6.3 [25], 7 [36], inhibitor ^d [16]	Y [63]
	minoxidil	>20 , NI	>300 [36]	N [64]
No DILI concern	furosemide	>80 , NI	>100 [25]	Conflicting information [65]
	acetylsalicylic acid	>100 , NI	>300 [36]	N [66]

Table 1. Cont.

DILI Concern	Compound	IC ₅₀ (μM), Based on Digoxin ER	In Vitro Literature Data (IC ₅₀ , μM)	ABCB1 Interactor
other	idelalisib	>5, NI	a	Y [67]
	asunaprevir ^c	>5, NI	a	Y [68]
	valsopodar	0.15	Inhibitor ^d [16]	Y [69]
	prazosin ^e	16.12	a	Y [70]
	zosuquidar	0.07	a	Y [71]
	mibefradil	0.40	a	Y [72]
	elacridar	0.15	a	Y [73]

NI—no inhibition observed, ^a There are no data available, ^b 30–50% inhibition at concentrations ranging from 1–100 μM with no clear dose response, ^c Asunaprevir is not curated in the LTKB database, ^d IC₅₀ value was not determined, ^e Ambiguous DILI-concern.

2.4. Identification of a Novel ABCB4 Transporter Substrate

As a next step, we also tested whether the two most potent inhibitors in the group of TKIs are ABCB4 substrates. Gefitinib at a concentration of 0.5 μM showed directional transport with an ER higher than 2 (4.02 at 60 min, 2.54 at 120 min and 3.23 at 180 min) in the ABCB4 cell line. The corresponding ERs in the Mock cells were very close to unity (Figure 2a). ABCB4-mediated transport of gefitinib was inhibited by itraconazole (2 μM). These results indicate that gefitinib is an inhibitor and a substrate of human ABCB4. In contrast, the corresponding ERs in ABCB4 and Mock cells were below 2 for imatinib, suggesting that although imatinib inhibits the function of ABCB4, it is not a substrate for this transporter (Figure 2b).

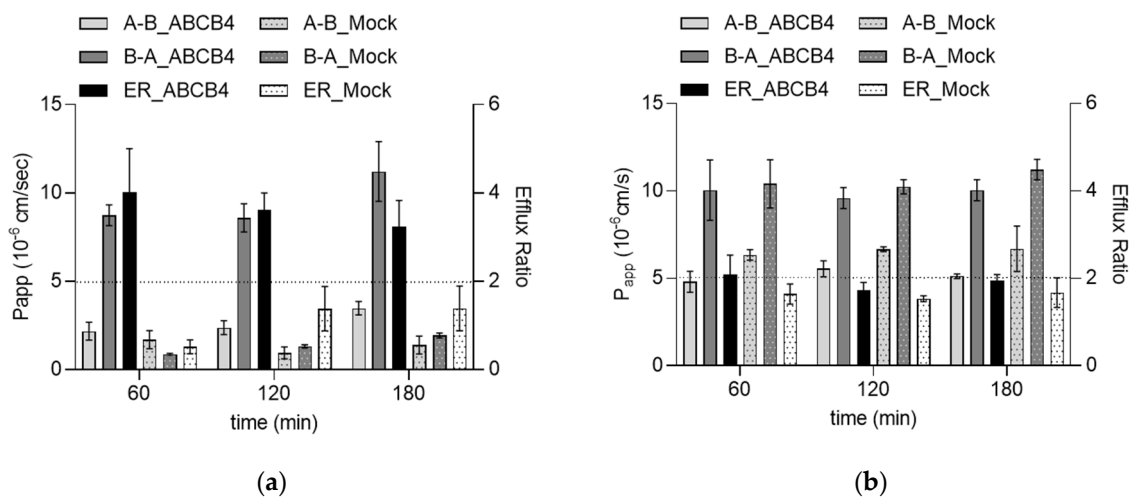


Figure 2. Transcellular transport of TKIs in the ABCB4 and Mock cells. **(a)** Bidirectional transport of gefitinib. ABCB4 and Mock cells were incubated with 0.5 μM gefitinib for 60, 120 or 180 min. Data are represented as means ± S.D. for three experiments. Gefitinib concentration in the samples was determined with LC-MS/MS. **(b)** Bidirectional transport of imatinib. ABCB4 and Mock cells were incubated with 0.5 μM imatinib for 60, 120 or 180 min. Imatinib concentration in the samples was determined with LC-MS/MS. Data are represented as means ± S.D. from three independent experiments.

3. Discussion

Finding an efficient non-hepatocyte based in vitro model to study interactions between chemical entities and ABCB4 is still challenging. A few ABCB4 non-hepatocyte-based cellular assays have been reported, including ABCB4-transfected LLC-PK1 and HEK293 cells [13,74,75]. However, a major disadvantage of these cell lines is that they retain the expression of endogenous transport proteins [76–78], which might functionally interfere

with the introduced transporter of interest [79]. Previous studies support that cell lines with a genomic knockout of the endogenous transporters, e.g., canine *Abcb1*, are more sensitive and overall, more suitable for assays of an introduced transporter [80,81].

In the present study, we successfully developed a cell line, *Abcb1KO-MDCKII-ABCB4*, which lacks endogenous canine *Abcb1* activity and expresses the human *ABCB4* transporter. Thorough characterization of the cell line with digoxin, a shared substrate of both *ABCB1* and *ABCB4*, resulted in an assay capable of detecting *ABCB4* inhibitors and substrates in an easy-to-use format. This cell line was then utilized to test a versatile array of drugs as potential inhibitors and/or substrates of *ABCB4*. For these inhibition studies, 30 drugs with different DILI outcomes were chosen from the Liver Toxicity Knowledge Base of the FDA, and seven more, structurally diverse, compounds were added to this list. In line with the literature data, we have here confirmed the interactions of many of these drugs (itraconazole, verapamil, ketoconazole, ritonavir, saquinavir and valsopodar) with the *ABCB4* protein in bidirectional assays. When comparing our results with those presented by He et al. [25] and Aleo et al. [36], however, a few things are worth noting. First, the above-mentioned primary hepatocyte assays utilize labeled PC to test *ABCB4*-dependent transport inhibition. He et al. tested the inhibitory potency of structurally distinct cholestatic drugs (chlorpromazine, imipramine, itraconazole, haloperidol, ketoconazole, saquinavir, clotrimazole, ritonavir, and troglitazone) [25]. In the latter study 125 drugs, grouped by the severity of liver injury caused, were tested [36]. Our assay detected all interactions reported in these studies, with only one exception, and drugs that did not interact with the *ABCB4* protein in hepatocytes did not interact in our system either. Of note is that the IC_{50} values for *ABCB4* inhibition obtained in our study are much lower than those obtained in hepatocyte assays. The results suggest that our assay can detect potential *ABCB4* interactors with higher sensitivity compared with primary hepatocyte assays. Possible explanations include the difference in the substrate used and/or transporter protein abundance.

For a correct interpretation of MDCKII assay results, specific features of these cells need to be considered. For instance, the IC_{50} value of benzbromarone in our assay was much higher than in hepatocytes. Benzbromarone is metabolized by CYP2C9, and its toxic effect is believed to be mainly caused by its metabolites [82]. It can be speculated that the potent inhibitory effect observed in hepatocytes is partially caused by the metabolite. In general, in hepatocyte-based assays, both the parent drug and its metabolites may affect the assay readout [83], whereas in MDCKII cells, production of metabolites does not interfere with the effect of the parent drug.

Another feature of the MDCKII bidirectional assay is that transcellular transport as well as intracellular accumulation might be limited by the diffusion rate across the basolateral membrane or depend on the presence of endogenous SLC transporters. Such an example is methotrexate, which did not show inhibition in our assay. However, methotrexate potently inhibited *ABCB4* with an IC_{50} of 3.1 μ M in a human primary hepatocyte assay [36]. Since methotrexate is a hydrophilic dicarboxylic acid and shows low Papp in MDCKII cells [84], it is hypothesized that its transport is limited by the diffusion rate and cannot accumulate intracellularly to exert its inhibitory effect. In contrast, OATP1B1 and OATP1B3 can substantially contribute to the intracellular accumulation of methotrexate in hepatocytes [55,85].

Our results show that several potent *ABCB1* inhibitors, such as verapamil, ketoconazole, valsopodar, zosuquidar, cyclosporin A and mibefradil, inhibit *ABCB4* activity. TKIs, such as gefitinib, imatinib, sorafenib and erlotinib, are classified as Most-DILI-concern drugs and are well known *ABCB1* interactors [67,86–89]. In our assay, we demonstrated for the first time that all four TKIs also inhibited the function of *ABCB4*, which might contribute to the DILI properties of these drugs. Additionally, we identified gefitinib as a substrate of *ABCB4*. To our best knowledge, this is the first demonstration of the interaction of these TKIs with *ABCB4*.

Previous results suggest that several drugs are shared inhibitors of *ABCB4* and *ABCB11* transporters [36], supporting the earlier finding by Mahdi et al. that if a drug inhibits the

function of both transporters, its cholestatic effect may increase [35]. These results imply that during drug development, combined drug–drug interaction tests, which include the transporters involved in hepatocellular bile acid homeostasis and bile formation (ABCB11, ABCB4 and ABCC2), may help to screen for drug candidates causing liver injury. However, the functional and clinical impacts of ABCB4 inhibition in the development of DILI require further investigation.

Unlike hepatocyte-based assays, our ABCB4 cell line is suitable to identify even low affinity non-phospholipid substrates of ABCB4. This feature of our assay is put into context by recent studies that point to the importance of ABCB4 in non-hepatobiliary tumors. High levels of ABCB4 expression have been reported in different leukaemias, even without co-expression with ABCB1 [90]. In leukaemia cells, daunorubicin accumulation is dependent on transporter inhibition with Cyclosporin A [91], indicating that ABCB4 is able to remove ABCB1 substrates from cancer cells and may play an active role in drug resistance. In a similar pattern, ABCB4 mediated the efflux transport of doxorubicin *in vitro* and contributed to the acquired resistance of doxorubicin in breast cancer cells [92]. Previous reports showed that ABCB4 and ABCC1 overexpression correlates with high-risk and significantly shorter disease-free survival time in patients with Wilms tumors (WT). This suggests the role of ABCB4 and ABCC1 in drug resistance observed in WT treatment [21].

In conclusion, we report here a novel assay that specifically measures ABCB4 activity using an ABCB4-overexpressing canine *Abcb1* knockout MDCKII cell line. In terms of inhibition of this transporter, the positive and negative hits obtained in hepatocytes were reproduced in our assay with even higher sensitivity. We propose that the *Abcb1*KO-MDCKII-ABCB4 bidirectional assay could be used to screen the potential of chemical entities to inhibit ABCB4 transport activity to improve DILI prediction or assist in elucidating the mechanism of DIC. This is a superior system for ABCB4 substrate identification to aid drug development.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Non-radiolabeled chemicals were obtained from Merck/Sigma-Aldrich. Calcein AM was purchased from Invitrogen. All chemicals were of analytical grade. ^3H -digoxin ($^3\text{H(G)}$), 23.8 Ci/mmol), ^3H -prazosin ([7-methoxy- ^3H], 77.4 Ci/mmol) and Ultima Gold XR scintillation fluid were purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). ^3H -quinidine (^3H), 20 Ci/mmol) and ^3H -talinolol ([ring- $^3\text{H(G)}$], 20 Ci/mmol) were purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). ^3H -fexofenadine (^3H), 4.9 Ci/mmol) was purchased from Moravек Biochemicals Inc. (Brea, CA, USA). The Tetro™ cDNA Synthesis Kit was purchased from Meridian Bioscience (London, UK). The Light Cycler® 480 SYBR Green 1 master kit was obtained from Roche Applied Science (Foster City, CA, USA). 4–15% precast polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker (4.6–300 kDa) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland). Monoclonal human ABCB4 (P3II-26, sc-58221) primary antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA), and ABCB1 (C219) primary antibody was purchased from Enzo Life Sciences, Inc (Lausen, Switzerland). Secondary anti-mouse IgG antibody was obtained from ThermoFisher (# 62-6520). The BCA protein assay kit was obtained from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

4.2. Cell Lines and Culture Conditions

Madin–Darby canine kidney II (MDCKII) wildtype cells were obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC catalogue no. 00062107). A MDCKII-*Abcb1* biallelic KO (*Abcb1*KO-MDCKII) cell clone was generated by GenScript (Leiden, The Netherlands) using the CRISPR/Cas9 system to knockout the canine *Abcb1* gene. To confirm gene editing, after clonal expansion of the cells, genomic DNA was extracted, and the target regions were amplified by PCR using primer pairs for the expected

mutation sites. The genotype of this KO clone was determined by Sanger sequencing by GenScript. The phenotype was verified through transport assays using the ABCB1/Abcb1-specific substrates digoxin and talinolol.

Sequence verified cDNA encoding human ABCB4 (NCBI Reference Sequence: NM_000443.3) was synthesized and cloned into pCDH-CMV-EF1-Puro using 5' NheI and 3' NotI by GenScript, and lentiviral particles were generated in HEK293FT cells (Invitrogen/ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Transduced and antibiotic-selected Abcb1KO-MDCKII-ABCB4 cells were subjected to single cell cloning, and amplified clones were functionally tested for transporter-specific efflux activity. Four puromycin-resistant clones were isolated and tested for ABCB4 efflux activity using the known ABCB4 substrate digoxin [16] with a digoxin ER cut-off of two [93]. Based on this criterion and on ABCB4 mRNA and protein expression levels and cell culturing properties, the best clone was selected for continued validation and is hereafter referred to as the ABCB4 cell line. Empty vector transduced Abcb1KO-MDCKII-Mock cells were used as negative controls.

Cell cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 4500 mg/L of glucose, supplemented with GlutaMaxTM, 10% *v/v* fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Gibco/ThermoFisher) at 37 °C in 5% CO₂ at 95% humidity. The medium was replaced three times per week. Cells were harvested using TrypLETM Express (ThermoFisher) at 80 to 90% confluence and passaged or seeded.

For transport experiments, cells were seeded on MillicellTM High pore density 0.4 µm PCF cell culture plate inserts (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at a density of 2.27×10^5 /cm² and grown for 6 days at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% relative humidity. The culture medium was changed once, the day before the experiment.

4.3. Calcein AM-Based Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

The cells were detached with TrypLETM Express and washed with PBS once before use. The cells were suspended in 0.1 µM calcein AM diluted in DMEM without phenol red at a cell concentration of 1×10^6 cells/mL. The cells were incubated with calcein AM at 37 °C for 30 min, protected from light, and cells in suspension were intermittently agitated. The cells were kept on ice until the flow cytometry measurements. Cellular fluorescence reflecting the transport activity was measured by an Attune Nxt cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a blue (488 nm) laser. The calcein signal was detected in the BL1 channel (emission filter: 530/30 nm). Analysis of the data was carried out by the Attune Nxt Cytometer Software v3.1.2 (Thermo Fisher).

4.4. Bidirectional Transport Assays

Stock solution of the compounds were prepared freshly in dimethyl sulfoxide (DMSO). Donor solutions were prepared by diluting test compounds in Hanks' balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4. Prior to the transport studies, the cell monolayers were washed twice with pre-warmed HBSS and pre-incubated for 15 min in HBSS. The test compounds were added in triplicate to either the apical or basolateral sides of the monolayers, and HBSS was added to the receiver wells to start the transport assay. The cells were incubated with the compounds for indicated times at 37 °C, and permeability was measured both in the apical-to-basolateral (A-B) and basolateral-to-apical (B-A) directions. The apical chamber had a final volume of 0.125 mL, while the basolateral chambers contained 0.25 mL. Samples (35 µL) were withdrawn from the receiver compartments at 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 6 h, and from the donor compartments at 0 and 6 h. Sample volumes withdrawn at each time point were replaced with a corresponding volume of pre-warmed HBSS to maintain constant volumes during each experiment. All sample concentrations were corrected for dilution with replacement buffer during sampling.

In the inhibition studies, A-B and B-A permeabilities of digoxin (1 µM, traced with 0.17 µCi/mL ³H-digoxin) were investigated across ABCB4 cell monolayers in the absence or presence of increasing concentrations of putative inhibitors. Samples were collected

at 3 h. To determine the amounts of radiolabeled substrates (including digoxin) transported, samples mixed with liquid scintillation cocktail were measured with a MicroBeta2 microplate counter (PerkinElmer).

4.5. LC-MS Sample Preparation and Analytics

Samples from the receiver compartments as well as donor compartments and dosing solution were diluted as necessary and injected into LC-MS/MS. The compounds were separated on a Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 3×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ column (Agilent) using water and acetonitrile including 0.1% formic acid (*v/v*) as mobile phases in gradient modes. The HPLC system was coupled to an AB Sciex 5500 QTRAP Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer using an electrospray interface (AB Sciex LLC, Framingham, MA, USA). The mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring mode. Data analysis was performed with Analyst software (AB Sciex LLC).

4.6. Cell Monolayer Integrity

The integrity of tight junction dynamics in cell monolayers was monitored before and after the transport studies by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) using a World Precision Instrument, Epithelial Voltohmmeter system (Sarasota, FL, USA). The approximate TEER values were $100\text{--}120 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Lucifer Yellow as a paracellular permeability marker was used to check that the highest concentration of the putative inhibitors did not disturb the integrity of cell monolayers. In brief, HBSS containing the putative inhibitors and Lucifer yellow ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the apical chambers. Samples were collected from the basolateral chambers. Fluorescence of the dosing and receiver samples was measured at an excitation wavelength of 450 nm and an emission wavelength of 520 nm with FLUOstar OPTIMA Microplate Reader (BMG Labtech, Germany). Monolayers with Papp values $< 2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ were considered intact.

4.7. Real-Time qPCR

Total RNA was extracted from cells using the TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the Tetro kit, and TaqMan real-time qPCRs (assay ID Hs00240956_m1 for ABCB4) were performed (Invitrogen/ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Canine Gapdh (Assay ID Cf04419463_gH) was used as an internal control. In each sample, ABCB4 mRNA was normalized to Gapdh mRNA. Relative gene expression data were given as the fold change ($\Delta\Delta C_T$). Each sample's ABCB4 expression was first subtracted from its Gapdh expression to determine its ΔC_T . The $\Delta C_{T\text{Mock}}$ was then subtracted from the $\Delta C_{T\text{ABCB4}}$ to determine the $\Delta\Delta C_T$. The relative expression of ABCB4 was determined by the formula $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$.

4.8. Western Blot

Confluent Mock and ABCB4 cells grown on filters were washed twice with ice-cold PBS and lysed on ice in M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) buffer containing freshly added protease inhibitors. The lysate was centrifuged at $13,000 \times g$, 4°C for 10 min and the supernatant was collected. The total protein content was determined using the PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The lysate was mixed with LDS loading buffer 3:1, and total protein ($30 \mu\text{g}/\text{lane}$) was loaded and separated on 4–15% SDS-PAGE gradient gels. The proteins were then transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, blocked with 5% non-fat dry milk for nonspecific binding and probed with primary antibodies specific to human ABCB4 (1:1000) or human ABCB1 (1:1000), respectively, overnight. Following three 5-min washes with TBST (Tris buffered saline + 0.1% Tween 20), the blots were probed with secondary antibody in TBST (1:2000, anti-mouse IgG-HRP) at room temperature for 1 h. After the washing steps, the blots were visualized by ECL reagent (PierceTM ECL Western Blotting Substrate, #32106) by a BioRad ChemiDoc imaging system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Watford, UK).

4.9. Calculations

All the experimental conditions were run in triplicate wells and repeated in three biological replicates. The apparent permeability coefficient (P_{app} , expressed in 10^{-6} cm/s) was determined from the amount of compound transported per unit time according to the following equation:

$$P_{app} = \left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \times \left(\frac{1}{A \times C_0} \right) \quad (1)$$

where ΔQ (pmol) is the amount of substrate translocated to the receiver compartment by the end of incubation, Δt (s) is the duration of incubation, A (cm^2) is the filter surface area, and C_0 (pmol/cm^3) is the initial donor concentration of the substrate.

Sink conditions were fulfilled.

The mass balance (recovery) was defined as the sum of the test compound recovered from the receiver compartment and the test compound remaining in the donor compartment at the end of the experiment, divided by the initial donor amount. This was calculated according to: Recovery (%) = $(C_{D(\text{Fin})}V_D + C_{R(\text{Fin})}V_R)100/(C_{D(0)}V_D)$, where C_D and C_R are the concentrations on the donor (D) and receiver (R) sides of the monolayer at the start (0) or end (Fin) of the experiment, and V is used for each of the respective volumes.

In all experiments, the recovery for all tested substrates was >70%

The efflux ratio (ER) was calculated as $P_{app, B-A}/P_{app, A-B}$.

The ER of digoxin as a probe substrate was determined at all concentrations of the inhibitor and in the presence of the vehicle only. IC_{50} values were calculated from ER values by nonlinear regression analysis in GraphPad Prism 9 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24054459/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, C.T.-A. and Z.G.; methodology, C.T.-A.; validation, C.T.-A.; investigation, A.B., C.T.-A. and G.N.; writing—original draft preparation, C.T.-A.; writing—review and editing, Z.G. and G.N.; supervision, Z.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the company participation.

Acknowledgments: The authors are grateful to Eszter Patakiné Illés for assistance with cell culturing. The authors acknowledge György Várady at the Research Centre for Natural Sciences for assistance with FACS.

Conflicts of Interest: SOLVO Biotechnology, Charles River Laboratories Hungary, the employer of the authors, develops and commercializes reagents and assays to study membrane transporters. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Smith, A.J.; de Vree, J.M.; Ottenhoff, R.; Elferink, R.P.; Schinkel, A.H.; Borst, P. Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology* **1998**, *28*, 530–536. [[CrossRef](#)]
2. Smith, A.J.; Timmermans-Hereijgers, J.L.; Roelofsen, B.; Wirtz, K.W.; Van Blitterswijk, W.J.; Smit, J.J.; Schinkel, A.H.; Borst, P. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 263–266. [[CrossRef](#)]
3. Prescher, M.; Smits, S.H.J.; Schmitt, L. Stimulation of ABCB4/MDR3 ATPase activity requires an intact phosphatidylcholine lipid. *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 1605–1616. [[CrossRef](#)]
4. Linton, K.J. Lipid flopping in the liver. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 1003–1010. [[CrossRef](#)]

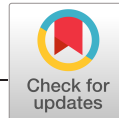
5. Smit, J.; Schinkel, A.; Elferink, R.; Groen, A.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.; Ottenhoff, R.; van der Lugt, N.; van Roon, M.; et al. Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **1993**, *75*, 451–462. [[CrossRef](#)]
6. Wang, H.H.; Portincasa, P.; Liu, M.; Wang, D.Q.-H. Effects of Biliary Phospholipids on Cholesterol Crystallization and Growth in Gallstone Formation. *Adv. Ther.* **2023**, *40*, 1–26. [[CrossRef](#)]
7. Stättermayer, A.F.; Halilbasic, E.; Wrba, F.; Ferenci, P.; Trauner, M. Variants in ABCB4 (MDR3) across the spectrum of cholestatic liver diseases in adults. *J. Hepatol.* **2020**, *73*, 651–663. [[CrossRef](#)]
8. Biyoukar, M.; Corpechot, C.; El Mouhadi, S.; Chambenois, E.; Vanderbecq, Q.; Barbu, V.; Dong, C.; Lemoine, S.; Tordjman, M.; Jomaah, R.; et al. A BCb4 variant is associated with hepatobiliary MR abnormalities in people with low-phospholipid-associated cholelithiasis syndrome. *JHEP Rep.* **2022**, *4*, 100590. [[CrossRef](#)]
9. Wang, H.H.; Portincasa, P.; Liu, M.; Wang, D.Q.-H. Genetic Analysis of ABCB4 Mutations and Variants Related to the Pathogenesis and Pathophysiology of Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis. *Genes* **2022**, *13*, 1047. [[CrossRef](#)]
10. van der Bliek, A.; Kooiman, P.; Schneider, C.; Borst, P. Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* **1988**, *71*, 401–411. [[CrossRef](#)]
11. Olsen, J.A.; Alam, A.; Kowal, J.; Stieger, B.; Locher, K.P. Structure of the human lipid exporter ABCB4 in a lipid environment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *27*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cuperus, F.J.C.; Claudel, T.; Gautherot, J.; Halilbasic, E.; Trauner, M. The Role of Canalicular ABC Transporters in Cholestasis. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 546–560. [[CrossRef](#)]
13. Van Helvoort, A.; Smith, A.; Sprong, H.; Fritzsche, I.; Schinkel, A.; Borst, P.; van Meer, G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **1996**, *87*, 507–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Morita, S.-Y.; Kobayashi, A.; Takanezawa, Y.; Kioka, N.; Handa, T.; Arai, H.; Matsuo, M.; Ueda, K. Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology* **2007**, *46*, 188–199. [[CrossRef](#)]
15. Ruetz, S. Phosphatidylcholine translocase: A physiological role for the mdr2 gene. *Cell* **1994**, *77*, 1071–1081. [[CrossRef](#)]
16. Smith, A.J.; van Helvoort, A.; van Meer, G.; Szabó, K.; Welker, E.; Szakács, G.; Váradi, A.; Sarkadi, B.; Borst, P. MDR3 P-glycoprotein, a Phosphatidylcholine Translocase, Transports Several Cytotoxic Drugs and Directly Interacts with Drugs as Judged by Interference with Nucleotide Trapping. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23530–23539. [[CrossRef](#)]
17. Ishigami, M.; Tominaga, Y.; Nagao, K.; Kimura, Y.; Matsuo, M.; Kioka, N.; Ueda, K. ATPase activity of nucleotide binding domains of human MDR3 in the context of MDR1. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA) -Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 683–690. [[CrossRef](#)]
18. Januchowski, R.; Wojtowicz, K.; Andrzejewska, M.; Zabel, M. Expression of MDR1 and MDR3 gene products in paclitaxel-, doxorubicin- and vincristine-resistant cell lines. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 111–117. [[CrossRef](#)]
19. Němcová-Fürstová, V.; Kopperová, D.; Balušíková, K.; Ehrlichová, M.; Brynychová, V.; Václavíková, R.; Daniel, P.; Souček, P.; Kovář, J. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *310*, 215–228. [[CrossRef](#)]
20. Wen, C.; Fu, L.; Huang, J.; Dai, Y.; Wang, B.; Xu, G.; Wu, L.; Zhou, H. Curcumin reverses doxorubicin resistance via inhibition the efflux function of ABCB4 in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 5162–5168. [[CrossRef](#)]
21. Hontecillas-Prieto, L.; Garcia-Dominguez, D.J.; Vaca, D.P.; Garcia-Mejias, R.; Marcilla, D.; Ramirez-Villar, G.L.; Saez, C.; de Álava, E. Multidrug resistance transporter profile reveals MDR3 as a marker for stratification of blastemal Wilms tumour patients. *Oncotarget* **2017**, *8*, 11173–11186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Watkins, P.B. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89*, 788–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Weaver, R.J.; Blomme, E.A.; Chadwick, A.; Copple, I.M.; Gerets, H.H.J.; Goldring, C.E.; Guillouzo, A.; Hewitt, P.G.; Ingelman-Sundberg, M.; Jensen, K.G.; et al. Managing the challenge of drug-induced liver injury: A roadmap for the development and deployment of preclinical predictive models. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *19*, 131–148. [[CrossRef](#)]
24. Yoshikado, T.; Takada, T.; Yamamoto, T.; Yamaji, H.; Ito, K.; Santa, T.; Yokota, H.; Yatomi, Y.; Yoshida, H.; Goto, J.; et al. Itraconazole-induced cholestasis: Involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 241–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. He, K.; Cai, L.; Shi, Q.; Liu, H.; Woolf, T.F. Inhibition of MDR3 Activity in Human Hepatocytes by Drugs Associated with Liver Injury. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 1987–1990. [[CrossRef](#)]
26. Bénichou, C. Criteria of drug-induced liver disorders: Report of an International Consensus Meeting. *J. Hepatol.* **1990**, *11*, 272–276. [[CrossRef](#)]
27. Yang, K.; Köck, K.; Sedykh, A.; Tropsha, A.; Brouwer, K.L. An updated review on drug-induced cholestasis: Mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 3037–3057. [[CrossRef](#)]
28. Chatterjee, S. Drug-induced Cholestasis: Mechanisms, Models, and Markers. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 808–818. [[CrossRef](#)]
29. Pauli-Magnus, C.; Stieger, B.; Meier, Y.; Kullak-Ublick, G.A.; Meier, P.J. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J. Hepatol.* **2005**, *43*, 342–357. [[CrossRef](#)]
30. Hafey, M.J.; Houle, R.; Tanis, K.Q.; Knemeyer, I.; Shang, J.; Chen, Q.; Baudy, A.; Monroe, J.; Sistare, F.D.; Evers, R. A Two-Tiered In Vitro Approach to De-Risk Drug Candidates for Potential Bile Salt Export Pump Inhibition Liabilities in Drug Discovery. *Drug Metab. Dispos.* **2020**, *48*, 1147–1160. [[CrossRef](#)]

31. Schadt, S.; Simon, S.; Kustermann, S.; Boess, F.; McGinnis, C.; Brink, A.; Lieven, R.; Fowler, S.; Youdim, K.; Ullah, M.; et al. Minimizing DILI risk in drug discovery—A screening tool for drug candidates. *Toxicol. Vitro* **2015**, *30*, 429–437. [[CrossRef](#)]
32. Chan, R.; Benet, L.Z. Measures of BSEP Inhibition In Vitro Are Not Useful Predictors of DILI. *Toxicol. Sci.* **2017**, *162*, 499–508. [[CrossRef](#)]
33. Morgan, R.E.; van Staden, C.J.; Chen, Y.; Kalyanaraman, N.; Kalanzi, J.; Dunn, R.T., II; Afshari, C.A.; Hamadeh, H.K. A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol. Sci.* **2013**, *136*, 216–241. [[CrossRef](#)]
34. Köck, K.; Ferslew, B.C.; Netterberg, I.; Yang, K.; Urban, T.J.; Swaan, P.; Stewart, P.W.; Brouwer, K.L.R. Risk Factors for Development of Cholestatic Drug-Induced Liver Injury: Inhibition of Hepatic Basolateral Bile Acid Transporters Multidrug Resistance-Associated Proteins 3 and 4. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *42*, 665–674. [[CrossRef](#)]
35. Mahdi, Z.M.; Synal-Hermanns, U.; Yoker, A.; Locher, K.P.; Stieger, B. Role of Multidrug Resistance Protein 3 in Antifungal-Induced Cholestasis. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *90*, 23–34. [[CrossRef](#)]
36. Aleo, M.D.; Shah, F.; He, K.; Bonin, P.D.; Rodrigues, A.D. Evaluating the Role of Multidrug Resistance Protein 3 (MDR3) Inhibition in Predicting Drug-Induced Liver Injury Using 125 Pharmaceuticals. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 1219–1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tupova, L.; Ceckova, M.; Temesszentandrás-Ambrus, C.; Šorf, A.; Ptackova, Z.; Gaborik, Z.; Staud, F. Interactions between Maraviroc and the ABCB1, ABCG2, and ABCG2 Transporters: An Important Role in Transplacental Pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* **2019**, *47*, 954–960. [[CrossRef](#)]
38. Wang, E.-J.; Lew, K.; Casciano, C.N.; Clement, R.P.; Johnson, W.W. Interaction of Common Azole Antifungals with P Glycoprotein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 160–165. [[CrossRef](#)]
39. Elsby, R.; Surry, D.D.; Smith, V.N.; Gray, A.J. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica* **2008**, *38*, 1140–1164. [[CrossRef](#)]
40. Yucha, R.W.; He, K.; Shi, Q.; Cai, L.; Nakashita, Y.; Xia, C.Q.; Liao, M. In Vitro Drug-Induced Liver Injury Prediction: Criteria Optimization of Efflux Transporter IC₅₀ and Physicochemical Properties. *Toxicol. Sci.* **2017**, *157*, 487–499. [[CrossRef](#)]
41. Katoh, M.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Inhibitory potencies of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists to P-glycoprotein-mediated transport: Comparison with the effects on CYP3A4. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1189–1197. [[CrossRef](#)]
42. de Weerd, I.; Koopmans, S.M.; Kater, A.P.; van Gelder, M. Incidence and management of toxicity associated with ibrutinib and idelalisib: A practical approach. *Haematologica* **2017**, *102*, 1629–1639. [[CrossRef](#)]
43. Leggas, M.; Panetta, J.C.; Zhuang, Y.; Schuetz, J.D.; Johnston, B.; Bai, F.; Sorrentino, B.; Zhou, S.; Houghton, P.J.; Stewart, C.F. Gefitinib Modulates the Function of Multiple ATP-Binding Cassette Transporters In Vivo. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4802–4807. [[CrossRef](#)]
44. Thomas, J.; Wang, L.; Clark, R.E.; Pirmohamed, M. Active transport of imatinib into and out of cells: Implications for drug resistance. *Blood* **2004**, *104*, 3739–3745. [[CrossRef](#)]
45. Agarwal, S.; Sane, R.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. The Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in the Distribution of Sorafenib to the Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 223–233. [[CrossRef](#)]
46. Marchetti, S.; de Vries, N.A.; Buckle, T.; Bolijn, M.J.; van Eijndhoven, M.A.J.; Beijnen, J.H.; Mazzanti, R.; van Tellingen, O.; Schellens, J.H.M. Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCG2 on erlotinib hydro-chloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2280–2287. [[CrossRef](#)]
47. Telbisz, A.; Ambrus, C.; Móznér, O.; Szabó, E.; Várady, G.; Bakos, E.; Sarkadi, B.; Özvegy-Laczka, C. Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 81. [[CrossRef](#)]
48. Fujimoto, H.; Higuchi, M.; Watanabe, H.; Koh, Y.; Ghosh, A.K.; Mitsuya, H.; Tanoue, N.; Hamada, A.; Saito, H. P-Glycoprotein Mediates Efflux Transport of Darunavir in Human Intestinal Caco-2 and ABCB1 Gene-Transfected Renal LLC-PK1 Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1588–1593. [[CrossRef](#)]
49. Mendell, J.; Zahir, H.; Matsushima, N.; Noveck, R.; Lee, F.; Chen, S.; Zhang, G.; Shi, M. Drug-Drug Interaction Studies of Cardiovascular Drugs Involving P-Glycoprotein, an Efflux Transporter, on the Pharmacokinetics of Edoxaban, an Oral Factor Xa Inhibitor. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2013**, *13*, 331–342. [[CrossRef](#)]
50. Fuhr, L.M.; Marok, F.Z.; Hanke, N.; Selzer, D.; Lehr, T. Pharmacokinetics of the CYP3A4 and CYP2B6 Inducer Carbamazepine and Its Drug-Drug Interaction Potential: A Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling Approach. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 270. [[CrossRef](#)]
51. Lam, A.; Hoang, J.D.; Singleton, A.; Han, X.; Bleier, B.S. Itraconazole and clarithromycin inhibit P-glycoprotein activity in primary human sinonasal epithelial cells. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 477–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tsujimura, S.; Tanaka, Y. Potential of B-cell-targeting therapy in overcoming multidrug resistance and tissue invasiveness associated with P-glycoprotein expressing-B cell compartments. *Immunol. Med.* **2021**, *44*, 142–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sikri, V.; Pal, D.; Jain, R.; Kalyani, D.; Mitra, A.K. Cotransport of Macrolide and Fluoroquinolones, a Beneficial Interaction Reversing P-glycoprotein Efflux. *Am. J. Ther.* **2004**, *11*, 433–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Frost, C.E.; Byon, W.; Song, Y.; Wang, J.; Schuster, A.E.; Boyd, R.A.; Zhang, D.; Yu, Z.; Dias, C.; Shenker, A.; et al. Effect of ketoconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *79*, 838–846. [[CrossRef](#)]

55. Abe, T.; Unno, M.; Onogawa, T.; Tokui, T.; Kondo, T.N.; Nakagomi, R.; Adachi, H.; Fujiwara, K.; Okabe, M.; Suzuki, T.; et al. LST-2, A human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1689–1699. [[CrossRef](#)]
56. Anglicheau, D.; Pallet, N.; Rabant, M.; Marquet, P.; Cassinat, B.; Méria, P.; Beaune, P.; Legendre, C.; Thervet, E. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine–sirolimus interaction. *Kidney Int.* **2006**, *70*, 1019–1025. [[CrossRef](#)]
57. Kim, A.E.; Dintaman, J.M.; Waddell, D.S.; Silverman, J.A. Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 1439–1445.
58. Ehrhardt, M.; Lindenmaier, H.; Burhenne, J.; Haefeli, W.; Weiss, J. Influence of lipid lowering fibrates on P-glycoprotein activity in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *67*, 285–292. [[CrossRef](#)]
59. Pauli-Magnus, C.; Rekersbrink, S.; Klotz, U.; Fromm, M.F. Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2001**, *364*, 551–557. [[CrossRef](#)]
60. Höll, V.; Kouba, M.; Diemel, M.; Vogt, G. Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 2601–2608. [[CrossRef](#)]
61. Kakumoto, M.; Sakaeda, T.; Takara, K.; Nakamura, T.; Kita, T.; Yagami, T.; Kobayashi, H.; Okamura, N.; Okumura, K. Effects of carvedilol on MDR1-mediated multidrug resistance: Comparison with verapamil. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 81–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Fromm, M.F.; Kim, R.B.; Stein, C.M.; Wilkinson, G.R.; Roden, D.M. Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. *Circulation* **1999**, *99*, 552–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Seelig, A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 576559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ozawa, M.; Tsume, Y.; Zur, M.; Dahan, A.; Amidon, G.L. Intestinal Permeability Study of Minoxidil: Assessment of Minoxidil as a High Permeability Reference Drug for Biopharmaceutics Classification. *Mol. Pharm.* **2014**, *12*, 204–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hoosain, F.G.; Choonara, Y.; Tomar, L.K.; Kumar, P.; Tyagi, C.; du Toit, L.; Pillay, V. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 484963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Singh, R.; Naik, T.; Nigam, A.; Chatterjee, S.; Rajanna, P.; Shen, H.; Iyer, R. Is aspirin a substrate of MDR1/P-glycoprotein? *Xenobiotica* **2020**, *50*, 1258–1264. [[CrossRef](#)]
67. Jin, F.; Nd, M.R.; Zhou, H.; Moyer, C.; Wilbert, S.; Murray, B.; Ramanathan, S. Clinical drug interaction profile of idelalisib in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *55*, 909–919. [[CrossRef](#)]
68. Eley, T.; Garimella, T.; Li, W.; Bertz, R.J. Asunaprevir: A Review of Preclinical and Clinical Pharmacokinetics and Drug–Drug Interactions. *Clin. Pharmacokinet.* **2015**, *54*, 1205–1222. [[CrossRef](#)]
69. Tai, H.L. Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2000**, *2*, 459–467.
70. Shapiro, A.; Fox, K.; Lam, P.; Ling, V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *259*, 841–850. [[CrossRef](#)]
71. Rubin, E.H.; de Alwis, D.P.; Pouliquen, I.; Green, L.; Marder, P.; Lin, Y.; Musanti, R.; Grospe, S.L.; Smith, S.L.; Toppmeyer, D.L.; et al. 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.* **2002**, *8*, 3710–3717. [[PubMed](#)]
72. Wandel, C.; Kim, R.B.; Guengerich, F.P.; Wood, A.J. Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 895–898. [[PubMed](#)]
73. Dash, R.P.; Babu, R.J.; Srinivas, N.R. Therapeutic Potential and Utility of Elacridar with Respect to P-glycoprotein Inhibition: An Insight from the Published In Vitro, Preclinical and Clinical Studies. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 915–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Groen, A.; Romero, M.R.; Kunne, C.; Hoosdally, S.J.; Dixon, P.H.; Wooding, C.; Williamson, C.; Seppen, J.; Van Den Oever, K.; Mok, K.S.; et al. Complementary Functions of the Flippase ATP8B1 and the Floppase ABCB4 in Maintaining Canalicular Membrane Integrity. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1927–1937.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gordo-Gilart, R.; Andueza, S.; Hierro, L.; Martínez-Fernández, P.; D'Agostino, D.; Jara, P.; Alvarez, L. Functional analysis of ABCB4 mutations relates clinical outcomes of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 to the degree of MDR3 floppase activity. *Gut* **2014**, *64*, 147–155. [[CrossRef](#)]
76. Evers, R.; Zaman, G.J.; Van Deemter, L.; Jansen, H.; Calafat, J.; Oomen, L.C.; Elferink, R.P.O.; Borst, P.; Schinkel, A.H. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 1211–1218. [[CrossRef](#)]
77. Goh, L.-B.; Spears, K.J.; Yao, D.; Ayrton, A.; Morgan, P.; Wolf, C.R.; Friedberg, T. Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1569–1578. [[CrossRef](#)]
78. Çakıl, Y.D.; Khunweeraphong, N.; Parveen, Z.; Schmid, D.; Artaker, M.; Ecker, G.; Sitte, H.; Pusch, O.; Stockner, T.; Chiba, P. Pore-Exposed Tyrosine Residues of P-Glycoprotein Are Important Hydrogen-Bonding Partners for Drugs. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *85*, 420–428. [[CrossRef](#)]
79. Gartzke, D.; Fricker, G. Establishment of Optimized MDCK Cell Lines for Reliable Efflux Transport Studies. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 1298–1304. [[CrossRef](#)]

80. Gartzke, D.; Delzer, J.; Laplanche, L.; Uchida, Y.; Hoshi, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T.; Sydor, J.; Fricker, G. Genomic Knockout of Endogenous Canine P-Glycoprotein in Wild-Type, Human P-Glycoprotein and Human BCRP Transfected MDCKII Cell Lines by Zinc Finger Nucleases. *Pharm. Res.* **2014**, *32*, 2060–2071. [[CrossRef](#)]
81. Simoff, I.; Karlgren, M.; Backlund, M.; Lindström, A.-C.; Gaugaz, F.Z.; Matsson, P.; Artursson, P. Complete Knockout of Endogenous Mdr1 (Abcb1) in MDCK Cells by CRISPR-Cas9. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 1017–1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wang, H.; Wang, W.; Gong, B.; Wang, Z.; Feng, Y.; Zhang, W.; Wang, S.; Peng, Y.; Zheng, J. Glutathione Conjugation and Protein Adduction Derived from Oxidative Debromination of Benzbromarone in Mice. *Drug Metab. Dispos.* **2019**, *47*, 1281–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zamek-Gliszczynski, M.J.; Hoffmaster, K.A.; Nezasa, K.-I.; Tallman, M.N.; Brouwer, K.L. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 447–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Furubayashi, T.; Inoue, D.; Nishiyama, N.; Tanaka, A.; Yutani, R.; Kimura, S.; Katsumi, H.; Yamamoto, A.; Sakane, T. Comparison of Various Cell Lines and Three-Dimensional Mucociliary Tissue Model Systems to Estimate Drug Permeability Using an In Vitro Transport Study to Predict Nasal Drug Absorption in Rats. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Van de Steeg, E.; van Esch, A.; Wagenaar, E.; Kenworthy, K.E.; Schinkel, A.H. Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 821–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Peng, X.-X.; Tiwari, A.K.; Wu, H.-C.; Chen, Z.-S. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. *Chin. J. Cancer* **2012**, *31*, 110–118. [[CrossRef](#)]
87. Agarwal, S.; Sane, R.; Gallardo, J.L.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. Distribution of Gefitinib to the Brain Is Limited by P-glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Active Efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 147–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Shukla, S.; Chen, Z.-S.; Ambudkar, S.V. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15*, 70–80. [[CrossRef](#)]
89. Wang, X.; Zhang, X.; Huang, X.; Li, Y.; Wu, M.; Liu, J. The drug–drug interaction of sorafenib mediated by P-glycoprotein and CYP3A4. *Xenobiotica* **2015**, *46*, 651–658. [[CrossRef](#)]
90. Herweijer, H.; Sonneveld, P.; Baas, F.; Nooter, K. Expression of mdr1 and mdr3 Multidrug-resistance Genes in Human Acute and Chronic Leukemias and Association With Stimulation of Drug Accumulation by Cyclosporine. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1133–1140. [[CrossRef](#)]
91. Nooter, K.; Sonneveld, P.; Janssen, A.; Oostrum, R.; Boersma, T.; Herweijer, H.; Valerjo, D.; Hagemeyer, A.; Baas, F. Expression of the mdr3 gene in prolymphocytic leukemia: Association with cyclosporin-A-induced increase in drug accumulation. *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 626–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Huang, J.-F.; Wen, C.-J.; Zhao, G.-Z.; Dai, Y.; Li, Y.; Wu, L.-X.; Zhou, H.-H. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 199–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Brouwer, K.L.R.; Keppler, D.; Hoffmaster, K.A.; Bow, D.A.J.; Cheng, Y.; Lai, Y.; Palm, J.E.; Stieger, B.; Evers, R. In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 95–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Baicalin is a substrate of OATP2B1 and OATP1B3

Bernadett Kalapos-Kovács^{1,2} | Viktória Juhász² | Csilla Temesszentandrás-Ambrus² | Balázs Magda³ | Pál T. Szabó³ | István Antal¹ | Imre Klebovich¹ | Péter Krajcsi^{2,4†}

¹Department of Pharmaceutics, Semmelweis University, 7 Hógyes E. utca Budapest, Budapest H-1092, Hungary

²SOLVO Biotechnology, 2 Gyár utca, Budaörs H-2040, Hungary

³Institute of Organic Chemistry, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, 2 Magyar Tudósok körútja, Budapest H-1117, Hungary

⁴Department of Morphology and Physiology, Faculty of Health Sciences, Semmelweis University, 17 Vas u, Budapest H-1088, Hungary

Correspondence

Péter Krajcsi, SOLVO Biotechnology, Budaörs, 2 Gyár utca, Budaörs H-2040, Hungary.
Email: krajcsi@solvo.com

The use and significance of baicalin, the main bioactive component found in *Radix Scutellaria*, have been on the rise due to its interesting pharmacological properties. Baicalin, a low passive permeability compound, is directly absorbed from the upper intestine and its hepatic elimination is dominant. However, interaction but no transport studies have implicated organic anion-transporting polypeptides in its cellular uptake. By using mammalian cells stably expressing the uptake transporters of interest, we are showing that baicalin is a potent substrate of Organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) and less potent substrate of OATP1B3. OATP2B1 and OATP1B3 transport baicalin and may play a role in the hepatic uptake of baicalin formed in the intestine.

KEYWORDS

baicalin, OATP, transporters, uptake

1 | INTRODUCTION

Baicalin (baicalein-7-O-glucuronide, BG) is the main bioactive component found in *Radix Scutellaria*, the dried root of the medicinal plant *Scutellariae baicalensis Georgi*, listed in the *Chinese Pharmacopoeia*.

Extensive research carried out in the last decade has led to the identification of BG and its aglycone baicalein (B), as important medical agents with multiple therapeutic benefits in a number of disease areas. Owing to its reasonably good pharmaceutical properties, BG has been shown to achieve adequate plasma concentration in vivo to elicit the purported pharmacological activity.

Intestinal absorption of BG is limited due to low solubility and there are data showing direct intestinal uptake of BG in the upper segments of small intestine (Lu et al., 2007). In addition, significant glucuronidation of B occurs in the intestine yielding BG, which is likely effluxed into the mesenteric blood by MRP3 and MRP4 localized in the basolateral membrane of enterocytes (Kalapos-Kovacs et al., 2015).

Several animal studies showed that BG, instead of B, was the predominant form in the systemic blood circulation after oral administration of B or BG and BG is eliminated hepatically (Zhang, Li, Lin, Krajcsi, & Zuo, 2011).

BG is a low passive permeability compound (Dai, Yang, & Li, 2008). Hence, cellular uptake of BG is likely transporter mediated. Interaction of BG with candidate uptake transporters Organic anion-transporting polypeptide OATP2B1 and OATP1B3 has been shown in inhibition assays (Zhang et al., 2011). In contrast, OATP1B1 and OATP1A2, the other hepatically and/or intestinally localized uptake transporters were not inhibited by BG (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2011).

In this study, we are showing that OATP2B1 and OATP1B3 are efficient transporters of BG and due to their localization, they may aid hepatic uptake of BG.

2 | MATERIALS AND METHODS

³H-Estradiol-17-β-D-glucuronide and ³H-Estrone-3-O-sulfate were purchased from Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, USA). Human embryonic kidney 293 cells stably overexpressing OATP1B3 (HEK293-OATP1B3), Madin-Darby canine kidney II cells stably overexpressing OATP2B1 (MDCKII-OATP2B1), and control cells (HEK293-Mock and wild type MDCKII (MDCKII-WT)) were obtained from Solvo

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette transporters; B, Baicalein; BG, Baicalin; ³H-E3S, ³H-Estrone-3-O-sulfate; HEK, Human embryonic kidney (293 cells); MDCK, Madin-Darby canine kidney II (cells); MRPs, multidrug resistance-associated proteins; OATPs, Organic anion-transporting polypeptides; RS, *Radix Scutellariae*; SLCs, Solute carrier transporters; MDCKII-WT, wild type MDCKII cells

[†]Share senior authorship.

Biotechnology (Szeged, Hungary). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Budapest, Hungary).

2.1 | Uptake experiments

2.1.1 | Cell culture and preparation

HEK293-OATP1B3, HEK293-Mock, MDCKII-OATP2B1, and MDCKII-WT cells were plated in a 24-well tissue culture plates at a density of 4×10^5 cells/well. For HEK293 cells, plates were precoated with poly-D-lysine. Feasibility studies and characterization of transport were performed 24 hr after seeding. Before experiments, cell culture medium was removed and the reaction was initiated by adding transport buffer (Henseleit-Krebs buffer: KCl 4.83 mM, KH_2PO_4 0.96 mM, NaHCO_3 23.8 mM, NaCl 142 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 1.53 mM, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid 12.5 mM, D-glucose 5 mM, and pH 7.4).

2.1.2 | Incubations

For feasibility screening, experiments were performed by adding BG at two different concentrations (1 μM and 10 μM) and the cells were incubated at 37 °C for 2 or 20 min. Experiments were carried out three times in triplicates.

For time course, cells were incubated at 37 °C for the indicated periods (1–45 or 1–60 min for OATP2B1 and OATP1B3, respectively) after adding 5 (in case of OATP2B1) or 10 μM (in case of OATP1B3) BG to the transport medium in transfected and control cells. Experiments were carried out twice in triplicates.

For concentration dependence, experiments were performed by adding different concentrations of BG (1–100 μM in case of OATP2B1 and 21.09–2700 μM in case of OATP1B3) to the transport medium in transfected and control cells. The cells were incubated at 37 °C for 3 (OATP2B1) and 45 min (OATP1B3). Experiments were carried out three times in triplicates.

2.1.3 | Sample preparation and analysis

The uptake was terminated by the addition of ice-cold transport medium and immediate rinsing of cells twice with ice-cold transport medium. Cells were lysed with methanol-water (2:1) solution, and the plates were centrifuged at 5,000 g for 10 min, 4 °C. Supernatants were transferred into a U-bottom plate and vacuum dried. Samples were dissolved in eluent. The amount of accumulated BG was determined by LC-MS/MS analysis (Magda et al., 2015).

2.2 | Protein quantitation

Bicinchoninic acid kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to check the total protein concentrations in cells. Positive control experiments with specific substrates of the transporters were performed to control the activity of the cells.

2.3 | Data analysis

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for curve fitting. Statistical significance was calculated with one-way analysis of variance.

Data shown in the figures are arithmetic means with standard deviation ($\pm\text{SD}$). Chemical properties were predicted using the physicochemical property predictor software (Chemaxon Ltd, Budapest, Hungary).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

OATPs have been long considered to play a role in cellular uptake of BG, a low permeability molecule with predicted values of 0.76, -2.65 , and -2.98 for $\log P$, $\log D_{6.5}$, and $\log D_{7.4}$, respectively, and an apparent permeability of around 9×10^{-7} cm/s in MDCKII cells (Li et al., 2012). Inhibition studies have identified OATP2B1 and OATP1B3 as potential transporters of BG (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2011). Cellular uptake of BG was therefore tested in OATP2B1 and OATP1B3 overexpressing cell lines as well as in control cells.

Our feasibility screen performed at two concentrations (1 and 10 μM) at two timepoints (2 and 20 min) showed that BG exhibited a statistically significant uptake into OATP2B1-expressing cells compared with MDCKII-WT control cells at all four conditions, with high significance at two conditions (Figure 1a). In contrast, BG uptake into OATP1B3-expressing cells compared with HEK293-Mock control cells was statistically significant only at two conditions both utilizing a 20-min incubation time (Figure 1b).

Average fold increase of the uptake of BG into OATP2B1 expressing cells over the uptake into wild type MDCKII cells was above 2 at all conditions with the minimum value of 5.40 ± 2.68 at 10 μM and 2 min and the maximum value of 22.55 ± 9.37 at 1 μM and 20 min (Figure 1c). For OATP1B3, the fold increase was above 2 (3.31 ± 0.79) under one condition (10 μM and 20 min; Figure 1d).

Thus, OATP2B1 mediated transport of BG appeared to be significantly greater than OATP1B3 mediated transport at all conditions. Kinetic characterization was carried out for both transporters.

Time dependence of BG uptake by OATP2B1 exhibited linear kinetics for up to 5 min (Figure 2a), and showed linearity in the whole test concentration in the case of OATP1B3 (Figure 2b).

Therefore, concentration dependence of OATP2B1- and OATP1B3-mediated uptake of BG was assessed at a 3- or a 45-min incubation time, respectively. BG transport by OATP2B1 was saturable (Figure 2c) and displayed transporter specific K_m , V_{max} , and intrinsic clearance (Cl_{int}) values of 9.71 ± 3.56 μM , 1163.87 ± 857.10 pmol/mg protein/min, and 162.13 ± 98.58 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein, respectively. A less potent OATP1B3-mediated transport was observed with K_m , V_{max} , and intrinsic clearance (Cl_{int}) values of 59.62 ± 9.60 , 997.2 ± 254.70 pmol/mg protein/min, and 20.31 ± 5.05 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein, respectively (Figure 2d).

OATP2B1 is expressed in the apical/luminal membrane of enterocytes and, along with OATP1B3, in the basolateral/sinusoidal membrane of hepatocytes (Zhou, Zhu, Wang, & Murray, 2016). Therefore, OATP2B1 may mediate intestinal uptake of dietary BG as well as, along with OATP1B3, the hepatic uptake of dietary and intestinally formed BG.

OATP2B1 may mediate absorption via cooperation of MRP3 and MRP4 basolaterally localized in the enterocytes (Zhang et al., 2007). In addition, it may cooperate with OATP1B3, and with BCRP and MRP2

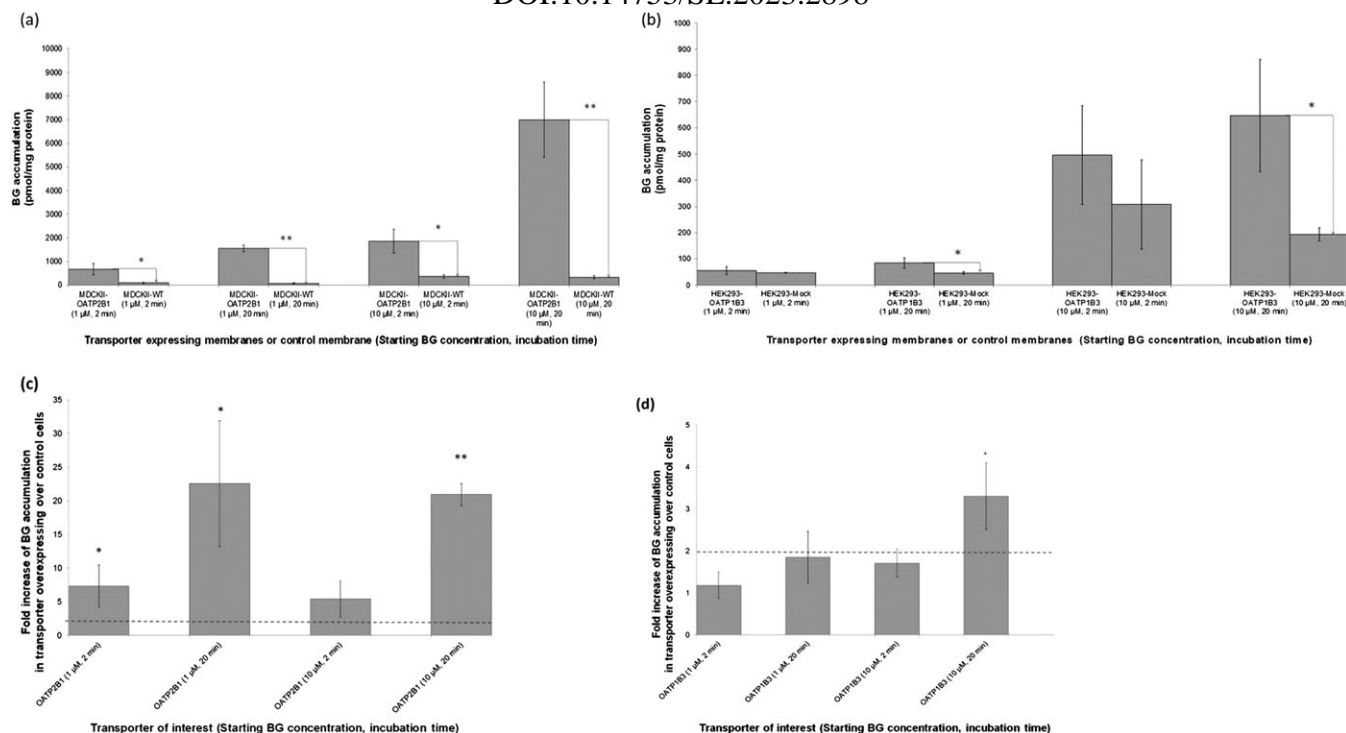


FIGURE 1 (a) Feasibility screen of uptake of BG at two incubation times, two concentrations by MDCKII-OATP2B1 and MDCKII-WT cells. $*p < .05$, $**p < .005$. (b) Feasibility screen of uptake of BG at two incubation times, two concentrations by HEK293-OATP1B3 and HEK293-Mock cells. $*p < .05$, $**p < .005$. (c) Fold increase of BG accumulation in transporter overexpressing over control cells ($\text{Uptake}_{\text{MDCKII-OATP2B1}}/\text{Uptake}_{\text{MDCKII-WT}}$) at two incubation times, two concentrations. The dashed line indicates the cut-off value of 2. (d) Fold increase of BG accumulation in transporter overexpressing over control cells ($\text{Uptake}_{\text{HEK293-OATP1B3}}/\text{Uptake}_{\text{HEK293-Mock}}$) at two incubation times, two concentrations. The dashed line indicates the cut-off value of 2. MDCKII = Madin-Darby canine kidney II; OATP = organic anion-transporting polypeptide; BG = baicalin; HEK = human embryonic kidney

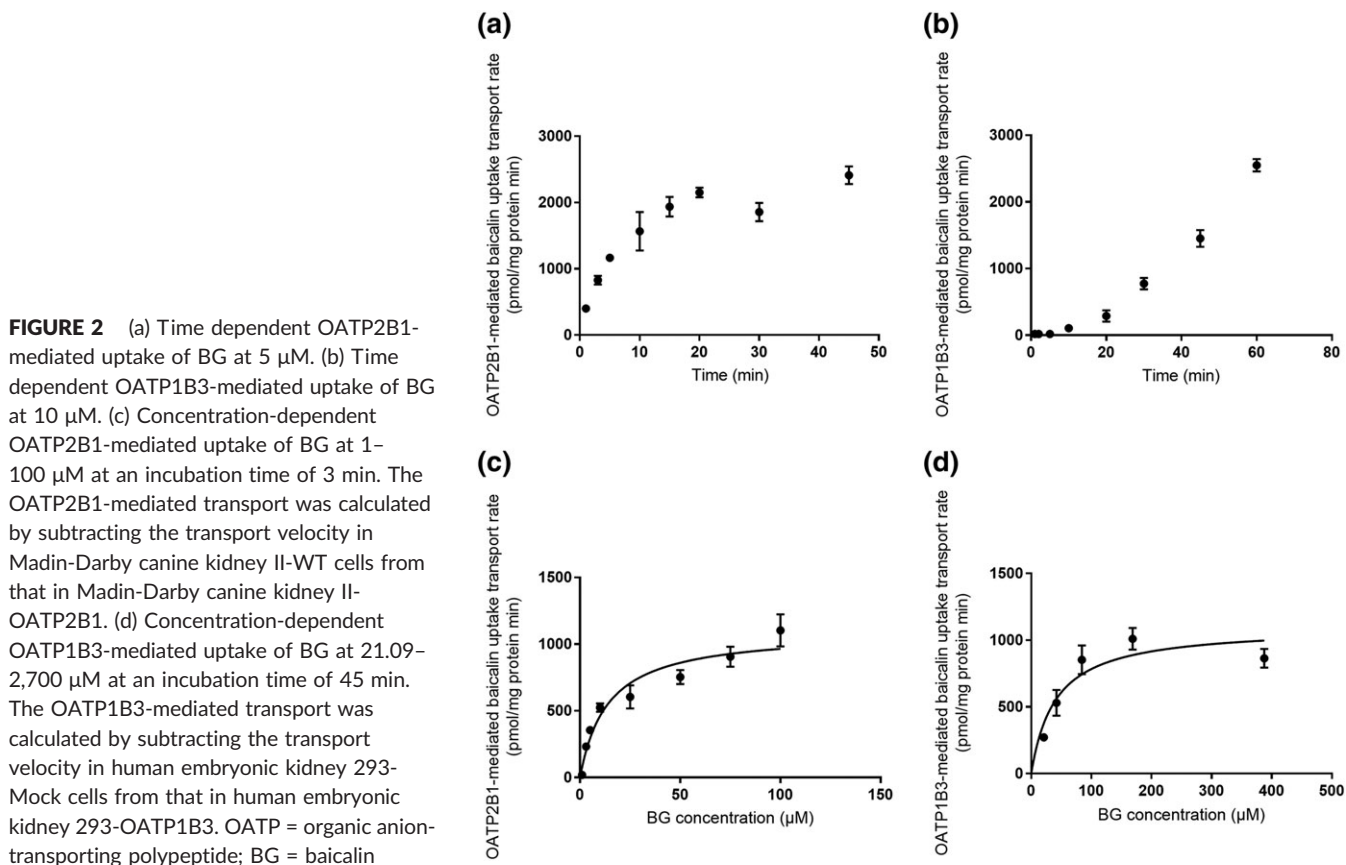


FIGURE 2 (a) Time dependent OATP2B1-mediated uptake of BG at 5 μM . (b) Time dependent OATP1B3-mediated uptake of BG at 10 μM . (c) Concentration-dependent OATP2B1-mediated uptake of BG at 1–100 μM at an incubation time of 3 min. The OATP2B1-mediated transport was calculated by subtracting the transport velocity in Madin-Darby canine kidney II-WT cells from that in Madin-Darby canine kidney II-OATP2B1. (d) Concentration-dependent OATP1B3-mediated uptake of BG at 21.09–2,700 μM at an incubation time of 45 min. The OATP1B3-mediated transport was calculated by subtracting the transport velocity in human embryonic kidney 293-Mock cells from that in human embryonic kidney 293-OATP1B3. OATP = organic anion-transporting polypeptide; BG = baicalin

expressed in the apical/canalicular membrane of hepatocytes to mediate hepatic elimination of BG (Kalapos-Kovacs et al., 2015). Considering the importance of BG, demonstration of a role for OATP2B1 and OATP1B3 in pharmacokinetics of BG using physiologically based pharmacokinetics modeling is warranted.

CONFLICT OF INTEREST

Solvo Biotechnology, the employer of some of the authors, develops and commercializes reagents and assays to study membrane transporters. None of the non-Solvo employees disclosed a conflict of interest.

ORCID

Bernadett Kalapos-Kovács  <http://orcid.org/0000-0002-3645-1220>

REFERENCES

- Dai, J. Y., Yang, J. L., & Li, C. (2008). Transport and metabolism of flavonoids from Chinese herbal remedy Xiaochaihu-tang across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Acta Pharmacologica Sinica*, *29*, 1086–1093.
- Kalapos-Kovacs, B., Magda, B., Jani, M., Fekete, Z., Szabo, P. T., Antal, I., ... Klebovich, I. (2015). Multiple ABC transporters efflux baicalin. *Phytotherapy Research*, *29*, 1987–1990.
- Li, C., Zhang, L., Zhou, L., Wo, S. K., Lin, G., & Zuo, Z. (2012). Comparison of intestinal absorption and disposition of structurally similar bioactive flavones in *Radix scutellariae*. *The AAPS Journal*, *14*, 23–34.
- Lu, T., Song, J., Huang, F., Deng, Y., Xie, L., & Wang G Liu, X. (2007). Comparative pharmacokinetics of baicalin after oral administration of pure baicalin, *Radix scutellariae* extract and Huang-Lian-Jie-Du-Tang to rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *110*, 412–418.
- Magda, B., Marta, Z., Imre, T., Kalapos-Kovacs, B., Klebovich, I., Fekete, J., & Szabo, P. T. (2015). Unexpected retention behavior of baicalin: Hydrophilic interaction like properties of a reversed-phase column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *111*, 119–125.
- Xu, F., Li, Z., Zheng, J., Gee Cheung, F. S., Chan, T., Zhu, L., & Zhuge H Zhou, F. (2013). The inhibitory effects of the bioactive components isolated from *Scutellaria baicalensis* on the cellular uptake mediated by the essential solute carrier transporters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *102*, 4205–4211.
- Zhang, L., Li, C. R., Lin, G., Krajcsi, P., & Zuo, Z. (2011). Hepatic metabolism and disposition of baicalein via the coupling of conjugation enzymes and transporters-in vitro and in vivo evidences. *Aaps Journal*, *13*, 378–389.
- Zhang, L., Lin, G., Kovacs, B., Jani, M., Krajcsi, P., & Zuo, Z. (2007). Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *31*, 221–231.
- Zhou, F., Zhu, L., Wang, K., & Murray, M. (2016). Recent advance in the pharmacogenomics of human solute carrier transporters (SLCs) in drug disposition. *Advanced Drug Delivery Reviews*, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.004>, *116*, 21–36.

How to cite this article: Kalapos-Kovács B, Juhász V, Temesszentandrás-Ambrus C, et al. Baicalin is a substrate of OATP2B1 and OATP1B3. *Phytotherapy Research*. 2018;1–4. <https://doi.org/10.1002/ptr.6095>