

Membrántranszporterek a xenobiotikum-gyógyszer és gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokban

Tézisfüzet

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. Töröcsik Beáta, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Váradi András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest
2023

1. Bevezetés

A multispecifikus gyógyszertranszporterek az ATP-kötő kazetta (ABC) és az oldott molekulákat hordozó (SLC) transzporterek szupercsaládjába tartoznak. Az ABC és SLC transzporterek szupercsaládjába jelen tudásunk szerint több mint 500 fehérje tartozik. A legtöbb emlős ABC transzporter elsődleges aktív transzporterként működik, a szubsztrátok sejtbe való eltávolítását végzi. Az SLC-k vagy a passzív facilitált diffúzióban vesznek részt vagy szekunder aktív transzporterekként működnek, de ismertek terciér aktív transzporterek is. Normál fiziológias körülmények közt az SLC fehérjék -kevés kivételtől eltekintve- különféle molekulák sejtbe való felvételét végzik.

Ezek a transzport fehérjék fiziológias szerepük mellett döntően befolyásolják a gyógyszerek abszorpcióját, disztribúcióját, metabolizmusát, eliminációját (ADME) és toxicitását. Így fontos szerepet játszanak a gyógyszerfejlesztés folyamatában, gyógyszerek 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.

2. Célkitűzés

A kutatómunkához részben már rendelkezésre álltak a szükséges, jól karakterizált alapszerek, 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.

A részletes célok 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. A Vichem Chemie Kutató Kft. munkatársai által fejlesztett MtTopo-I inhibitorok közül 7 jelöltet választottunk további kísérletek elvégzésére. Nemzetközi kooperációban végzett részmunka 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 expresszálandó ABCB4 alapvető szerepet játszik az epeképzés folyamatában,

gyógyszerekkel és/vagy metabolitjaikkal történő gátlása kolesztázist és gyógyszer-indukálta májkárosodást okozhat (DILI). 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-overexpresszáló MDCKII sejtvonallal létrehozását tűztük ki célul, melyben az ABCB4 fehérjével rokon endogén kutya Abcb1 fehérjét kódoló gént kiüttöttük. 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 expresszálódó OATP fehérje lehet felelős a baikalin hepatocitákba történő aktív felvételéért.

3. Módszerek

Az ABC transzporterek és xenobiotikumok kölcsönhatásának vizsgálatára membrán és sejtalapú esszéket használtunk, illetve hoztunk létre.

a. Membránpreparátumok és ATPáz esszé

A humán ABCB1 és ABCG2 fehérjéket tartalmazó membránpreparátumok rekombináns bakulovírussal fertőzött Sf9 rovarsejtekből készültek. Az összegyűjtött sejtekből mechanikai homogenizálással és differenciál centrifugálással membránpreparátumot készítettünk. A vizsgált transzporterek vanadát-szenzitív alap és drogstimulálta ATPáz aktivitását a keletkező anorganikus foszfát komplex mennyiségének kolorimetriás mérésével jellemeztük, s meghatároztuk a transzporterspecifikus ATPáz aktivitást a felszabadult anorganikus foszfát (nmol)/perc/teljes fehérje tartalomként (mg).

b. ABCB1 és ABCG2 sejtes festéktranszport mérések

A kísérleteket már korábban lentivírusos transzdukcióval létrehozott ABCB1 és ABCG2 fehérjéket stabilan expresszáló PLB myeloid sejteken végeztük. ABCB1-specifikus 0,1 μM CAM vagy ABCG2-specifikus 1 μM DCV intracelluláris akkumulációját antituberkulotikum-jelöltek (5 μM) és ismert gátlószer jelenlétében, illetve anélkül is vizsgáltuk.

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

Vezikuláris transzport gátlás esszékben vizsgáltuk meg gógyszerek ABC transzporter szubsztrátok

transzportjára való hatását. A rekombináns bakulovírussal fertőzött rovarsejtből származó preparátumok az ABCC1 és ABCC2 fehérjék, a lentivírusos transzdukcióval létrehozott HEK293 emlős sejtekből származó membrán vezikula preparátumok az ABCB1, ABCG2, ABCC2, ABCC3, ABCC4 és ABCB11 fehérjék és gyógyszerek kölcsönhatás vizsgálatát tették lehetővé. ATP jelenlétében a szubsztrátokat az ABC transzporterek a vezikula belsejébe pumpálják; a vezikulákat megfelelő szűrési technikával elválasztottuk és a felhalmozott szubsztrátokat detektáltuk, mennyiségileg meghatároztuk gyógyszerek, illetve csak oldószer jelenlétében.

d. Uptake (SLC) transzportert kifejező sejt vonalak és esszék

HEK293 és MDCKII SLC transzportert kifejező sejt vonalakat hoztunk létre lentivírusos transzdukcióval, a kifejezett fehérjék transzport tulajdonságait jellemeztük és a sejt alapú esszéket ipari standardoknak megfelelően validáltuk. Megvizsgáltuk, hogy a gyógyszerek koncentrációfüggően gátolják-e a transzporter-specifikus szubsztrátok sejtbe történő felvételét. A baicalin OATP1B3- és OATP2B1-mediálta transzportját idő- és koncentrációfüggő kísérletekben jellemeztük.

e. ABCB4-expresszáló sejt vonal és transzcelluláris esszék

Az MDCKII-Abcb1 biallélikus knockout klónt karakterizáltuk (áramlási citometriás calcein esszé, célzott proteomikai és transzcelluláris transzport mérés). Majd az Abcb1KO-MDCKII sejtekben lentivírusos

transzdukcióval ABCB4 fehérjét overexpresszáltunk. A létrehozott sejtvonalban az ABCB4 fehérje expresszióját RT-PCR és Western blot segítségével ellenőriztük. A transzport mérésekhez a sejteket kettős kamrarendszerben polikarbonát sejttenyésztő inzertekre ültettük és differenciáltattuk. A gyógyszer-ABCB4 kölcsönhatást a digoxin kétirányú transzportjának változásával detektáltuk.

4. Eredmények

1. Újronnan fejlesztett *Mycobacterium tuberculosis* topoizomeráz-I inhibitorok kölcsönhatásának vizsgálata humán ABC transzportfehérjékkel

A Vichem Chemie Kutató Kft. munkatársai által fejlesztett MfTopo-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 sejtesszékből 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.

2. A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás rizikójának meghatározása

A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek transzporter kölcsönhatásainak vizsgálata során az alábbi eredményeket kaptuk: 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 expresszáldó 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 barrieréken 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 rizikófaktori. 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 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.

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-expresszázó 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 prazosin is az ABCB4 szubsztrátja. DILI kauzalitás alapján csoportokba osztott gyógyszerek vizsgálatakor az irodalmi adatokkal összhangban álltak eredményeink, illetve 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.

4. A baicalin kölcsönhatása OATP transzporterekkel

A baicalin vizsgálatakor azt találtuk, hogy a baicalin az OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék szubsztrátja. Affinitása nagyobb az OATP2B1 fehérjéhez, így a májba történő baicalin felvételért az OATP2B1 fehérje lehet felelős.

5. Következtetések

1. Újjonnan fejlesztett Mycobacterium tuberculosis topoizomeráz-I inhibitorok kölcsönhatásának vizsgálata humán ABC transzportfehérjékkel

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.

2. A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás rizikójának meghatározása

A COVID-19 kezelésére használt gyógyszerek transzporter kölcsönhatásainak vizsgálata során igazoltuk, hogy különböző komplexitású módszerek barrierspecifikus integrációjával gyógyszerek intesztinális felszívódásának, hepaticus exkréciójának, vér-agy gát penetrációjának és proximális tubuluson keresztüli szekréciójának vizsgálatával mechanisztikus és relevancia adatok egyaránt nyerhetők.

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

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

4. A baicalin kölcsönhatása OATP transzporterekkel

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

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Temesszentandrás-Ambrus C, Tóth S, Verma R, Bánhegyi P, Szabadkai I, Baska F, Szántai-Kis C, Hartkoorn RC, Lingerfelt MA, Sarkadi B, Szakács G, Órfi 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**, 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 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.

Temesszentandrás-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, **Temesszentandrás-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.

6.2 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, **Temesszentandrásí-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)