

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA DE PAULA DUTRA

INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2:
REGULADORES DE EXPRESSÃO, REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E
SISTEMA DE *DRUG DELIVERY* BASEADO EM VESÍCULAS EXTRACELULARES
HUMANAS

CURITIBA

2022

JÚLIA DE PAULA DUTRA

INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2:
REGULADORES DE EXPRESSÃO, REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E
SISTEMA DE DRUG DELIVERY BASEADO EM VESÍCULAS EXTRACELULARES
HUMANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vivian Rotuno Moure
Valdameri

Coorientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

CURITIBA

2022

Dutra, Júlia de Paula

Inibidores do transportador ABCG2 [recurso eletrônico] : reguladores de expressão, reposicionamento de fármacos e sistema de *drug delivery* baseado em vesículas extracelulares humanas / Júlia de Paula Dutra – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Vivian Rotuno Moure Valdameri

Coorientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

1. Preparações farmacêuticas. 2. Neoplasias. 3. Transportadores de cassetes de ligação de ATP. 4. Reposicionamento de medicamentos. I. Valdameri, Vivian Rotuno Moure. II. Valdameri, Glaucio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JÚLIA DE PAULA DUTRA** intitulada: **Inibidores do transportador ABCG2: reguladores de expressão, reposicionamento de fármacos e sistema de drug delivery baseado em vesículas extracelulares humanas**, sob orientação da Profa. Dra. VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Agosto de 2022.

Vivian Rotuno Moure Valdameri

VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora

Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Giseli Klassen

GISELI KLASSEN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

“Eu dedico esse trabalho ao meu avô, Edmar, que, durante anos combateu o câncer, e, mesmo nos seus piores dias, sempre foi amoroso e bondoso com todos ao seu redor.

De onde estiver, espero que esteja orgulhoso.”

AGRADECIMENTOS

“Você pode sonhar, criar, projetar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer do sonho uma realidade” – Walt Disney

Com a plena certeza de que ninguém faz nada sozinho, eu gostaria de agradecer as várias pessoas que fizeram parte, direta ou indiretamente, desse projeto.

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer aos meus pais, Ricardo e Rogéria, por toda a dedicação que sempre tiveram a mim, todo o incentivo e apoio para que eu seguisse o caminho que sempre quis e por terem me dado o que eu tenho de mais valioso: os meus valores.

Ao meu companheiro de vida e minha maior fonte de incentivo, Vinícius, que, com todo o seu amor, sempre me encorajou, vibrou com as minhas conquistas e foi meu ponto de equilíbrio nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Vivian e Glaucio, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e suporte, e, por serem fonte de inspiração para seguir o caminho da ciência, com dedicação e respeito.

Aos meus amigos do laboratório, Arthur, Bruna, Giovana, Isadora, Ingrid, Kelly, Lucas, Marina e Manoella, pela troca de conhecimentos, por serem fonte de alegria nos dias em que tudo parecia dar errado, pela amizade e parceria. Mas, principalmente, por todos os cafezinhos com chocolate pós almoço.

À minha parceira de mestrado, Gabriela, por ser minha companhia em disciplinas, pela troca de experiências, por ser minha mentora no pacote Office e sempre torcer por mim.

Aos meus amigos de fora da universidade, pela amizade, e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcel Ramirez e sua aluna Izadora Rossi por participarem e ajudarem no projeto de vesículas extracelulares.

Ao Gustavo e Thales por auxiliarem na obtenção do docking e dinâmica molecular.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade de pesquisa.

À CAPES, Fundação Araucária e CNPq pela bolsa e pelo financiamento deste projeto. Por fim, agradeço a todos aqueles, que direta ou indiretamente, ajudaram nessa pesquisa.

"Nothing contributes so much to tranquilize
the mind as a steady purpose - a point on
which the soul may fix its intellectual eye"

-Mary Shelley

RESUMO

Um fator crucial que leva à resistência a múltiplas drogas (MDR) em câncer é a superexpressão de transportadores ABC. Entre eles, destacam-se: a glicoproteína P (P-gp) e ABCG2, que são mediadores do efluxo de diversos quimioterápicos, diminuindo sua concentração intracelular e, conseqüentemente, levando à falha da quimioterapia. Por isso, um considerável esforço tem sido dedicado à busca de agentes de reversão, eficazes para superar a MDR mediada por transportadores ABC, especialmente inibidores de ABCG2, uma vez que não há composto clinicamente disponível para esse fim, ao contrário de inibidores de P-gp, que têm sido utilizados em ensaios clínicos. Compostos químicos podem ter um modo de ação duplo na inibição de ABCG2: inibição da atividade do transportador e modulação de expressão. A utilização de moduladores da expressão de ABCG2 tem surgido como uma estratégia emergente para superar a MDR mediada por ABCG2 *in vitro*, com poucos exemplos *in vivo*. Entender os mecanismos pelos quais compostos são capazes de promover regulação transcricional e pós-traducional da expressão de ABCG2 pode direcionar futuros experimentos e melhorar a eficácia da quimioterapia. Classicamente, inibidores funcionais de ABCG2 têm sido mais estudados, com centenas de exemplos na literatura. Para acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos, a estratégia de reposicionamento de drogas foi escolhida para esse trabalho. Ainda, considerando o contexto atual da pandemia COVID-19, drogas reposicionadas como candidatas ao tratamento de COVID-19: cloroquina, hidroxicloroquina, dexametasona, lopinavir, ivermectina, oseltamivir, prednisolona e hidroclorisona foram estudadas quanto ao potencial de serem inibidores de ABCG2. Lopinavir e ivermectina foram capazes de inibir a atividade de ABCG2 pelo transporte de Hoechst 33342 com concentração inibitória na metade da máxima (IC₅₀) de 25,5 e 23,4 uM, respectivamente. Características estruturais e mecanismos moleculares de lopinavir e ivermectina como inibidores de ABCG2 foram elucidados: tipo de inibição não-competitiva, ligação aumentada do anticorpo conformacional 5D3 a ABCG2, ausência de efeito de regulação gênica e proteica do transportador, predição das interações drogas-ABCG2 por docking e dinâmica molecular. Finalmente, para superar a baixa solubilidade em água de compostos inibidores de transportadores ABC sistemas de nanopartículas foram estudados para a entrega das drogas. Nesse trabalho, vesículas extracelulares (VEs) de células sanguíneas obtidas por vesiculação com cálcio e naturalmente secretadas encontradas no plasma foram usadas com sucesso para a entrega de chromona 4a para inibir ABCG2 e elacridar para inibir P-gp. Aqui, pela primeira vez, mostramos o uso potencial de VEs do sangue para sistemas de entrega de drogas hidrofóbicas visando proteínas de membrana.

Palavras-chave: câncer; resistência; transportadores ABC; reposicionamento de drogas; sistemas de entrega de drogas.

ABSTRACT

A crucial factor leading to multidrug resistance (MDR) in cancer is the overexpression of ABC transporters. Among them, are highlighted: P-glycoprotein (P-gp) and ABCG2 are widely recognized as efflux mediators of several chemotherapeutic agents, thus decreasing their intracellular concentration and, consequently, leading to chemotherapy failure. Therefore, considerable effort has been devoted to the search for effective reversal agents to overcome MDR mediated by ABC transporters, especially ABCG2 inhibitors, since there is no clinically available compound for this purpose, unlike P-gp inhibitors, which has been used in clinical trials. Chemical compounds may have a dual mode of action in inhibiting ABCG2: inhibition of transporter activity and modulation of expression. The use of ABCG2 expression modulators has emerged as an emerging strategy to overcome ABCG2-mediated MDR *in vitro*, with few examples *in vivo*. Understanding the mechanisms by which compounds are able to promote transcriptional and post-translational regulation of ABCG2 expression may guide future experiments and improve the effectiveness of chemotherapy. Classically, functional inhibitors of ABCG2 have been the most studied, with hundreds of examples in the literature. To accelerate the drug development process, the drug repositioning strategy was chosen in this work. Also, considering the current context of the COVID-19 pandemic, drugs repositioned as candidates for the treatment of COVID-19: chloroquine, hydroxychloroquine, dexamethasone, lopinavir, ivermectin, oseltamivir, prednisolone and hydrocortisone were studied for their potential to be ABCG2 inhibitors. Lopinavir and ivermectin were able to inhibit ABCG2 activity by transporting Hoechst 33342 with half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 25.5 and 23.4 μ M, respectively. Structural characteristics and molecular mechanisms of lopinavir and ivermectin as ABCG2 inhibitors were elucidated: non-competitive inhibition type, increased binding of conformational antibody 5D3 to ABCG2, lack of gene and protein regulatory effect of the transporter, prediction of drug-ABCG2 interactions by docking and molecular dynamics. Finally, to overcome the low water solubility of ABC transporter inhibitor compounds, nanoparticle systems were studied for drug delivery. In this work, extracellular vesicles (EVs) from blood cells obtained by calcium vesiculation and naturally secreted found in plasma were successfully used for the delivery of chromone 4a to inhibit ABCG2 and elacridar to inhibit P-gp. Here, for the first time, we show the potential use of blood EVs for hydrophobic drug delivery systems targeting membrane proteins.

Key-words: cancer; resistance; ABC transport; drug repositioning; drug-delivery.

OBJETIVOS

- Produção de um artigo de revisão abordando os mecanismos de regulação de expressão do transportador ABCG2 a nível transcricional e proteico.
- Estudo de interação de oito fármacos que foram reposicionados e amplamente utilizados no Brasil usados para tratamento da COVID-19 com o transportador ABCG2.
 - Avaliação dos medicamentos como substratos de ABCG2
 - Avaliação do perfil de citotoxicidade dos medicamentos em células embrionárias de rim humano HEK-293 selvagem e transfectada de forma estável para superexpressão de ABCG2;
 - Screening dos oito medicamentos como inibidores de ABCG2 em linhagens celulares HEK-293/ABCG2;
 - Determinação do IC50 por citometria de fluxo;
 - Determinação do tipo de inibição;
 - Verificação da alteração conformacional pela ligação ao 5D3;
 - Verificação dos sítios de interação entre os medicamentos e ABCG2 por *docking* e dinâmica molecular.
- Estudo de uma nova formulação farmacêutica baseada em vesículas extracelulares de células sanguíneas e do plasma, para incorporação de inibidores dos transportadores ABC ABCG2 e glicoproteína P e entrega em células.
 - Submissão do projeto ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Paraná;
 - Coleta de sangue dos voluntários e obtenção das vesículas extracelulares;
 - Avaliação do efeito de inibição dos inibidores pela entrega por vesículas extracelulares por citometria de fluxo.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Mecanismos envolvidos na MDR em células de câncer.....	20
FIGURA 2 - Mecanismo de transporte dos substratos.....	22
FIGURA 3 - Estrutura 3D de ABCG2 ligado ao substrato (esquerda) e ligado ao ATP (direita)	24
FIGURA 4 - Representação estrutural da glicoproteína P humana em uma conformação voltada para dentro.....	25
FIGURA 5 - Origem das vesículas celulares: exossomos e microvesículas	33

CAPÍTULO 1

FIGURE 4 - Proposed mechanism of action of compounds in reducing ABCG2 expression.....	46
---	----

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 - ABCG2 inhibition by flow cytometry.....	91
FIGURE 2 - Cytotoxicity and absence of transport mediated by ABCG2 transporter.....	93
FIGURE 3 - ABCG2 inhibition by flow cytometry	95
FIGURE 4 - Kinect behavior of mitoxantrone ABCG2-mediated efflux by flow	97
FIGURE 5 - Molecular docking and molecular dynamic simulations.....	98

CAPITULO 3

FIGURA 1 - Inibição de ABCG2 e P-gp pelos inibidores Cromona 4a e Elacridar, respectivamente, incorporados às VEs.....	122
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 3 - Modulators of ABCG2 expression levels.....	50
---	----

CAPÍTULO 2

TABLE 1 - Nucleotide sequences of primers used for RT-qPCR.....	86
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	-	Cassete de ligação de ATP
AHR	-	Aryl hydrocarbon receptor / Receptor de hidrocarboneto aril
AKT	-	Protein kinase B / Proteína cinase B
AP1	-	Activator protein 1 / Ativador de proteína 1
BBB	-	Barreira hematoencefálica
BCRP	-	Breast cancer resistance protein / Proteína de resistência ao câncer de mama
CSC	-	Cancer stem cells / Células-tronco do câncer
DBC	-	Drug binding cavity / Cavity de ligação a drogas
ECGC	-	Polyphenol epigallocatechin gallate / Galato de epigallocatequina polifenol
EGFR	-	Epidermal growth factor receptor / Receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	-	Endoplasmatic reticulum / Retículo endoplasmático
ERK	-	Extracellular signal-regulated kinase / Cinase regulada por sinal extracelular
E2	-	17 β -estradiol
FBS	-	Fetal bovine serum / Soro fetal bovino
FDA	-	Food and Drug Administration
FTC	-	Fumitremorgin C / Fumitremorgina C
GF120918	-	Elacridar
GM-CSF	-	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HADC	-	Histone deacetylase / Histona desacetilase
HIF-1	-	Hypoxia-inducible factor 1 / Fator indutor de hipóxia 1
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	-	Concentração do composto que resulta na metade da inibição máxima
INCA	-	Instituto Nacional de Câncer
IVT	-	Ivermectina
JNK	-	c-Jun amino-terminal kinase / c-Jun amino terminal cinase
LMA	-	Leucemia mielóide aguda

LPV	-	Lopinavir
LYTAC	-	Lysosome-targeting chimeras / Quimeras direcionadas ao lisossomo
LY335979	-	Zosuquidar
MAGE	-	Antígenos associados a melanoma
MAPK	-	Mitogen-activated protein kinase / Proteína cinase ativadora de mitógeno
MBL-II-141	-	Cromona 6g
MD	-	Molecular dynamic / Dinâmica molecular
MDR	-	Resistência a múltiplas drogas
MDR1	-	Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
MEK	-	MAPK/ERK kinase / MAPK/ERK cinase
MHC	-	Proteínas do complexo principal de histocompatibilidade
miRNAs	-	MicroRNAs
MRP1	-	Proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas
MS-209	-	Dofequidar
MTT	-	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide / Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio
MTX	-	Mitoxantrone / Mitoxantrona
NBDs	-	Domínios de ligação de nucleotídeos citoplasmáticos
NRF2	-	Nuclear factor E2-related factor 2 / Fator nuclear E2 relacionado ao fator 2
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PBS	-	Phosphate buffer saline / Tampão fosfato-salino
P-gp	-	Glicoproteína P
PPAR γ	-	Peroxisome proliferator-activated receptors / Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PSC-833	-	Valspodar
PTEN	-	Effector phosphatase and tensin homologue / Fosfatase efetora e homólogo de tensina
PI3K	-	Phosphatidylinositol-3-kinase / Fosfatidilinositol-3-quinase
RMSD	-	Root-mean square deviation / Desvio quadrático médio
ROCKS	-	Rho kinases / Rho cinases

R1011933	-	Laniquidar
SAHA	-	Suberoylanilide hydroxamic acid / Ácido hidroxâmico suberoilânida
SP1	-	Specific protein 1 / Proteína específica 1
TMDs	-	Domínios transmembrana
TSA	-	Trichostatin A / Tricostatina A
TSS	-	Transcription start site / Sítio de início da transcrição
TR	-	Therapeutic rate / Razão terapêutica
VEs	-	Vesículas extracelulares
VX-710	-	Biricodar
XR9576	-	Tariquidar

SUMÁRIO

1 RESUMO DA DISSERTAÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 CÂNCER E A MDR	19
2.2 TRANSPORTADORES ABC	20
2.2.1 <i>Transportador ABCG2</i>	24
2.2.2 <i>Glicoproteína P (P-gp)</i>	25
2.3 REVERSÃO DA MDR EM CÂNCER PELA INIBIÇÃO DE TRANSPORTADORES ABC.....	26
2.3.1 <i>Uso de inibidores de ABCG2</i>	27
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE DROGAS (<i>DRUG DELIVERY</i>) BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS	29
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 1	41
ABSTRACT	42
1. <i>Introduction</i>	43
7. MODULATORS OF ABCG2 EXPRESSION	44
7.1 <i>Transcriptional regulation</i>	46
7.2 <i>Posttranslational regulation</i>	49
8. CONCLUSIONS	56
REFERENCES	56
CAPÍTULO 2	80
ABSTRACT	81
1. INTRODUCTION.....	82
2. MATERIAL AND METHODS	84
2.1 <i>Materials</i>	84
2.2 <i>Cell cultures</i>	84
2.3 <i>Inhibition assay</i>	84
2.4 <i>Cell viability assay</i>	85
2.5 <i>Conformational antibody binding (5D3) assay</i>	85

2.6 RT-qPCR.....	86
2.7 Western blot	87
2.8 Protein selection and preparation for <i>in silico</i> studies.....	87
2.9 Molecular docking	87
2.10 Molecular dynamics simulations.....	88
2.11 Trajectory Analyses and MM/GBSA	89
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	89
3.1 Identification of COVID-19 drug candidates as ABCG2 inhibitors	89
3.2 Cytotoxicity and absence of ABCG2-mediated transport of COVID-19 drugcandidates.....	92
3.3 Mechanism of ABCG2 inhibition exploited by <i>in vitro</i> approaches.....	94
3.4 Molecular docking and dynamic simulations	97
REFERENCES	101
CAPÍTULO 3	105
RESUMO.....	106
REIVINDICAÇÕES	107
RELATÓRIO DESCRITIVO.....	108
CAMPO DA INVENÇÃO	108
FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA	108
DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO	113
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO	115
DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.....	116
REFERÊNCIAS.....	117
FIGURAS	122
FORMULÁRIO DE ATENDIMENTO – PEDIDO DE PATENTE.....	123
TERMO DE RESPONSABILIDADE	135
APÊNDICE.....	136
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	136

1 RESUMO DA DISSERTAÇÃO

Os achados descritos nessa dissertação fornecem uma nova compreensão a respeito do transportador ABCG2. Inicialmente, como diversos compostos naturais e sintéticos atuam na redução da expressão de ABCG2 e quais possíveis mecanismos de regulação gênica e proteica envolvidos. Posteriormente, o mecanismo de inibição desse transportador por lopinavir e ivermectina, utilizados para o tratamento de COVID-19 no Brasil, foi caracterizado. Finalmente, a obtenção de um sistema de *drug delivery* baseado vesículas extracelulares de células sanguíneas e do plasma, para o transporte de inibidores pouco solúveis em água de transportadores ABC, tanto ABCG2 quanto glicoproteína P. Assim, essa dissertação foi escrita da seguinte forma:

- Uma introdução geral para contextualização do tema, abordando o câncer, a resistência a múltiplas drogas e transportadores ABC: características gerais e inibidores, com foco no transportador ABCG2, e vesículas extracelulares como sistemas de liberação de drogas.
- O capítulo 1 mostra o artigo de revisão publicado na *European Journal of Medicinal Chemistry*, intitulado “*Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators*”, no qual fiz parte da elaboração do tópico “*Modulators of ABCG2 expression*”;
- O capítulo 2 mostra a identificação e caracterização do mecanismo de medicamentos utilizados no tratamento da COVID-19, como inibidores do transportador ABCG2;
- O capítulo 3 mostra uma nova formulação farmacêutica para a incorporação de inibidores de transportadores ABC, que não solubilizam em água, através de vesículas extracelulares de células sanguíneas e do plasma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER E A MDR

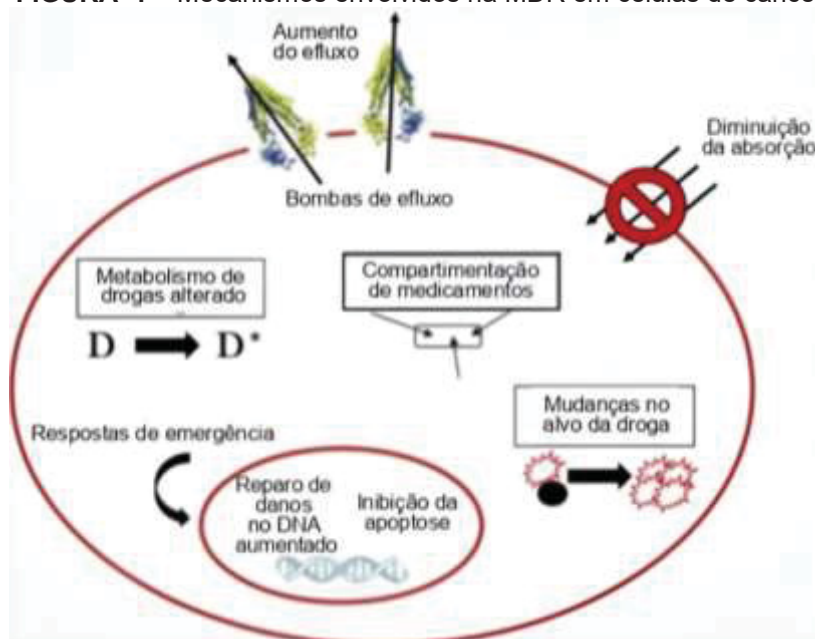
De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade), na maior parte dos países. Nos últimos dados publicados pelo INCA, estimava-se que de 2020 a 2022 ocorreriam cerca de 625 mil novos casos anuais de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente. Entretanto, em 2020, no Brasil, foram contabilizados 309.750 casos novos de câncer em homens, e 316.280 em mulheres, sendo o câncer de próstata o mais prevalente nos homens, e o de mama nas mulheres. A palavra câncer é derivada do grego *karkínos*, que significa caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, conhecido como o pai da medicina. Hoje, designamos como câncer, um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam como base, um crescimento anormal de células, que tendem a gerar metástases (ESTIMATIVA 2020: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL, 2019).

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em 2020 foram estimados 10 milhões de mortes por câncer em todo o mundo e para os próximos 10 anos estima-se que a mortalidade relacionada ao câncer aumentará em aproximadamente 30%. Os dados mais atuais sobre câncer indicaram uma incidência mundial de 19,3 milhões (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) de novos casos e 10,1 milhões de mortes em 2020 (GLOBOCAN, 2020). Os dados indicam que a maior parte da mortalidade de pacientes com câncer é causada pela resistência aos medicamentos (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

A resistência a múltiplas drogas, também conhecida como MDR, é expressa por meio de mecanismos que podem promover alterações funcionais e estruturais, que causam resistência a diferentes drogas. A MDR no câncer pode ocorrer por duas vias distintas: (1) A resistência natural que está relacionada às características pessoais genéticas e ocorre previamente ao tratamento; (2) A resistência adquirida, que está relacionada a alterações nas células tumorais e pode ser induzida por uma ampla gama de diferentes mecanismos (CHOI, YOUNG HEE; YU, 2014; GOTTESMAN, 2002). A MDR em células de câncer durante a quimioterapia pode

estar associada a vários mecanismos (Figura 1), como: fatores genéticos (mutações genéticas e amplificações), fatores de crescimento, aumento da capacidade de reparo do DNA, metabolismo elevado de xenobióticos e o efluxo de drogas mediado por transportadores ABC. Esses mecanismos levam à redução da eficácia terapêutica dos fármacos administrados, dificultando o tratamento (DALLAVALLE *et al.*, 2020; LUQMANI, 2005; WANG *et al.*, 2017; WANG; ZHANG; CHEN, 2019; WU *et al.*, 2014).

FIGURA 1 – Mecanismos envolvidos na MDR em células de câncer



FONTE: Adaptado de DALLAVALLE *et al.* (2020)

2.2 TRANSPORTADORES ABC

A cerca de 50 anos atrás, a linhagem celular HeLa foi descrita como resistente a actinomicina D, um quimioterápico antineoplásico, após a seleção com 0,1 µg/mL da droga (GOLDSTEIN; SLOTNICK; JOURNEY, 1960). Posteriormente, comprovou-se, em células de fibroblasto e pulmão de hamster chinês, que, além da resistência a actinomicina D, também havia resistência a outros antineoplásicos: vinblastina, vincristina e daunomicina (BIEDLER; RIEHM, 1970). Em 1973, estudos demonstraram que a daunomicina foi transportada para fora de células de Ehrlich de camundongos multirresistentes, indicando a existência de um transportador de membrana conferindo a resistência a múltiplas terapias (DANO, 1973). Já em 1976, pesquisadores identificaram em células ovarianas multirresistentes de hamster chinês o transportador, denominado glicoproteína P (P-gp), responsável pela resistência,

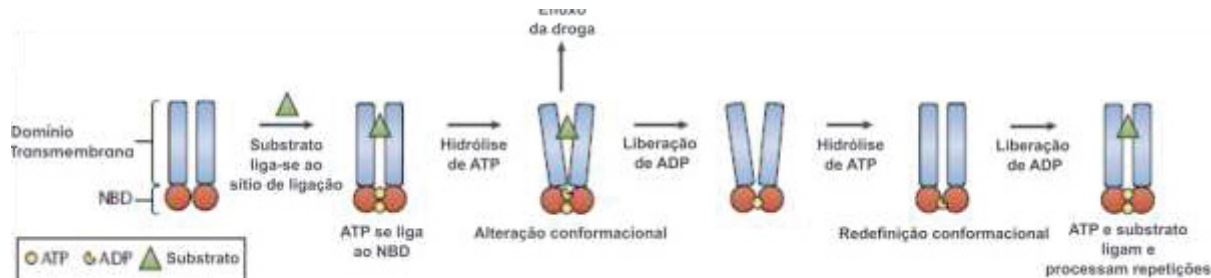
anteriormente relatada (JULIANO; LING, 1976). Após a clonagem e identificação humana deste transportador, o seu gene foi denominado como cassete de ligação de ATP (ABC, do inglês *ATP-binding cassette*), subfamília B, membro 1, *ABCB1*, e a respectiva proteína codificada por esse gene é a proteína 1 de resistência a múltiplas drogas, MDR1 (*ABCB1* ou P-gp) (GROS *et al.*, 1986; RONINSON *et al.*, 1986; UEDA *et al.*, 1986).

Após isso, mais estudos foram realizados para identificar outros membros da família ABC em humanos e elucidar os processos fisiológicos em que eles estão envolvidos (GOTTESMAN; LING, 2006). O segundo membro da família de transportadores ABC a ser identificado foi a proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas (MRP1), codificado pelo gene *ABCC1* (COLE *et al.*, 1992). Por ser um membro ubiquamente expresso da família de transportadores ABC e a falta de evidências que comprovem seu papel como marcador de resistência clínica aos medicamentos, este transportador não é o alvo mais adequado para a terapia anticâncer (MIRSKI, SHELAGH E. L., GERLACH, JAMES H., COLE, 1987; ROBEY *et al.*, 2018). Dentro de um curto intervalo de tempo entre 1998 e 1999, três grupos de pesquisa identificaram o terceiro membro da família ABC, o *ABCG2* (ou proteína de resistência ao câncer de mama, BCRP), codificado pelo gene *ABCG2* (ALLIKMETS *et al.*, 1998; DOYLE *et al.*, 1998; MIYAKE *et al.*, 1999). A partir de então, aumentou o interesse em estudos a respeito dos transportadores ABC e seus respectivos papéis na resistência clínica a múltiplas drogas, além da pesquisa de possíveis substratos, ou seja, as moléculas que são translocadas do meio intra para o meio extracelular (ROBEY *et al.*, 2018).

Atualmente, são encontrados no genoma humano 48 genes que codificam para proteínas da família ABC, cuja maioria são transportadores ABC. A família de proteínas ABC é dividida em sete subfamílias, nomeadas de A a G (AMBUDKAR *et al.*, 2003; DASSA; BOUIGE, 2001; SZAKÁCS *et al.*, 2006). De acordo com a estrutura e o arranjo dos domínios de ligação de nucleotídeos citoplasmáticos (NBDs) que se ligam e hidrolisam ATP e dois domínios transmembrana (TMDs), os transportadores podem ser classificados em transportadores completos, meios transportadores e proteínas ABC do tipo não transportador. Para que sejam funcionais, as estruturas dos transportadores ABC consistem em quatro domínios, sendo dois NBDs que se ligam e hidrolisam ATP e dois TMDs que reconhecem e transportam substratos (ROBEY *et al.*, 2018). A estrutura e função dos NBDs são considerados semelhantes

em todas as subfamílias, já os TMDs são heterogêneos e permitem que os transportadores reconheçam os substratos e utilizem a energia da hidrólise do ATP para deslocar as moléculas pela membrana, sem necessitarem de um gradiente de concentração (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001). Avanços recentes na determinação estrutural de ABCG2 e P-gp elucidaram mais claramente o mecanismo de transporte e a natureza poliespecífica de seus sítios de ligação ao substrato, ou seja, a capacidade de ligar um grande número de compostos quimicamente diversos (ESSER *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2021). Os domínios se reorganizam para transportar o substrato através da membrana plasmática por meio de três etapas gerais. (1) Após a ligação do ATP, os dois NBD se dimerizam. (2) As alterações conformacionais desencadeiam uma alta afinidade do substrato em um estado chamado voltado para dentro (*inward-facing*) para uma baixa afinidade do substrato em um estado chamado voltado para fora (*outward-facing*), que cria um canal para a translocação do substrato. (3) A hidrólise de ATP para retorno ao estado basal e reiniciar o ciclo de transporte (DOUGLAS C. REES, ERIC JOHNSON, 2009; SRIKANT; GAUDET; BIOLOGY, 2019).

FIGURA 2 - Mecanismo de transporte dos substratos



FONTE: Adaptado de Robey, *et al.* (2018)

O papel fisiológico dos transportadores está na proteção ao transportar substratos pelas membranas biológicas que estão envolvidos em processos de detoxificação celular e excreção de metabólitos endógenos, como sais biliares, ácido úrico glicuronídeo de bilirrubina, lipídeos, ânions orgânicos (BORST; ELFERINK, 2002; ROBEY *et al.*, 2018). Em especial, dois transportadores são mais relevantes por estarem associados ao fenômeno de MDR. São eles: glicoproteína P (P-gp ou MDR1, codificada pelo gene *ABCB1*) e ABCG2 (codificado pelo gene *ABCG2*) ou *breast cancer resistance protein* (BCRP)/ *mitoxantrone resistance protein* (MXR)/ *placenta ABC protein* (ABCP) devido à sua superexpressão nesses tumores. A partir

daqui eles estão descritos como P-gp e ABCG2, respectivamente. Esses transportadores estão superexpressos em diversos tipos de tumores, como leucemias, câncer de mama, hepatoma, entre outros, acarretando em mau prognóstico dos pacientes portadores desses tumores e são capazes de utilizar quimioterápicos antineoplásicos como substratos (GOTTESMAN, 2002). Em locais como a barreira hematoencefálica (BBB), barreira hemato-testicular e barreira hemato-placentária, a expressão dos transportadores ABC em células endoteliais capilares serve para prevenir a entrada de moléculas exógenas (DE LANGE, 2004; P KANNAN, C JOHN, SS ZOGHBI, C HALLDIN, MM GOTTESMAN, RB INNIS, 2009). Desta forma, os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do fármaco podem ser alterados (CHOI, YOUNG HEE; YU, 2014). Sendo assim, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA disponibiliza recomendações sobre como os medicamentos em investigação devem ser caracterizados em relação à sua capacidade de interação com os transportadores ABC, visto que a inibição destes transportadores pode levar a toxicidade ou alterações farmacocinéticas devido às possíveis interações farmacológicas (CHOI, YOUNG HEE; YU, 2014; U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2017).

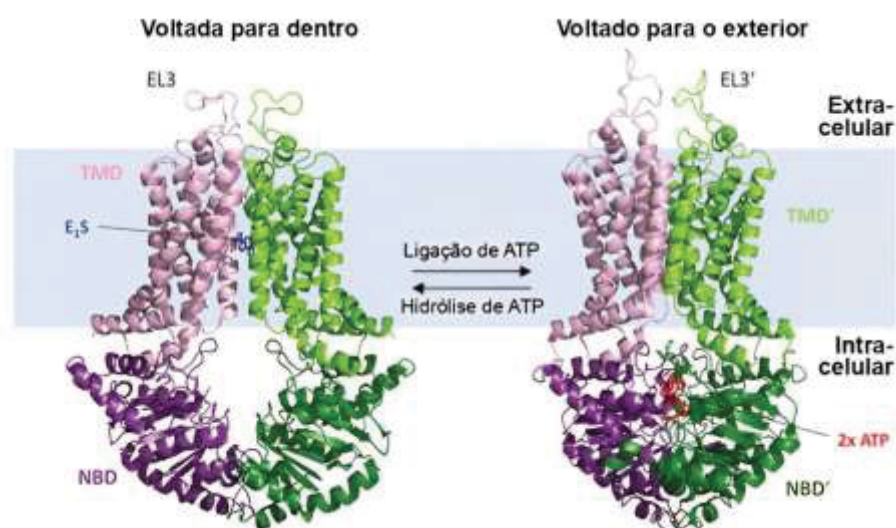
Um único tipo de tumor pode expressar vários transportadores ABC, como é o caso de um estudo que examinou a expressão de todos os 48 transportadores ABC humanos em 281 amostras de leucemia mieloide aguda (LMA). Encontrou-se que o aumento da expressão de uma análise multivariada em que a expressão de ABCB1, ABCG1 e ABCG2 estava relacionada com a resistência com a quimioterapia convencional utilizada e que vários outros transportadores ABC estavam co-expressos (MARZAC *et al.*, 2011; ROBEY *et al.*, 2018). Outro exemplo é um estudo em que foi correlacionado os níveis de expressão de mRNA de *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCC3* e *ABCG2* com a LMA infantil, e demonstrou-se que o número crescente de transportadores ABC co-expressos está relacionado a uma menor sobrevida livre de recidiva (BARTHOLOMAE *et al.*, 2016). Pesquisadores avaliaram um conjunto de 11 amostras pareadas (antes do tratamento e após tratamento) de pacientes com diagnóstico de LMA e recidiva, e observaram que 10 destas amostras apresentaram uma dupla superexpressão de pelo menos um dos transportadores ABC, capaz de transportar antraciclinas ou alcalóides da vinca (PATEL *et al.*, 2013). Estes dados sugerem que possa ser necessária a inibição de mais de um transportador para se atingir o benefício clínico (ROBEY *et al.*, 2018).

2.2.1 Transportador ABCG2

O ABCG2 é um meio transportador com um NBD localizado no citoplasma e um TMD com 6 segmentos alfa-hélices transmembranas, ou seja, uma estrutura chamada de NBD-TMD, com aproximadamente 75 kDa. Portanto, requer dimerização, formando estruturas homodiméricas ou heterodiméricas, para que possa desempenhar sua atividade como transportador (MO; ZHANG, 2012; SARKADI; HOMOLYA; HEGEDŰS, 2020) (Figura 2).

O ABCG2 está presente em tecidos humanos normais, expresso em sinciciotrofoblastos placentários, epitélio do intestino delgado e cólon, membranas canaliculares do fígado e dutos e lóbulos do tecido mamário (MALIEPAARD *et al.*, 2001). Sua expressão também está presente na membrana luminal de células epiteliais na vesícula biliar, pneumócitos alveolares, glândulas sebáceas, células intersticiais de testículos, epitélio da próstata, células endocervicais do útero, epitélio escamoso do colo uterino, ilhotas e células acinares do pâncreas, camada da zona reticular da glândula adrenal, túbulos corticais renais, hepatócitos e endotélio venoso e capilar (AUST *et al.*, 2004; FETSCH *et al.*, 2006; HULS *et al.*, 2008). O ABCG2 está, em grande parte, localizado na membrana plasmática das células destes tecidos, e atua com a função secretora ou de barreira (MO; ZHANG, 2012; ROCCHI *et al.*, 2000).

FIGURA 3 -Estrutura 3D de ABCG2 ligado ao substrato (esquerda) e ligado ao ATP (direita)



FONTE: Adaptado de ECKENSTALER e BENNDORF, 2020

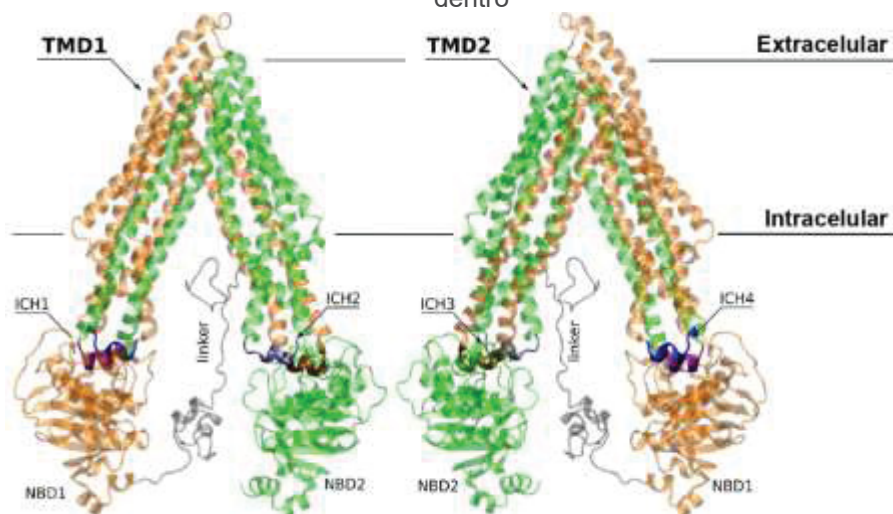
LEGENDA: ABCG2 é representado como um dímero de duas cadeias de proteínas ABCG2 (roxo e verde) com seu domínio de ligação de nucleotídeo (NBD) e domínio transmembrana (TMD) exibido em uma cor ligeiramente diferente. A ligação de uma molécula de substrato de estrona-3-sulfato (E1S,

azul) ocorre em uma cavidade entre os TMDs. Nesse estado, os NBDs estão com conformação voltada para dentro (*inward*). ABCG2 ligado ao ATP apresenta uma conformação marcadamente diferente. A ligação de duas moléculas de ATP induz a aproximação dos NBDs, forçando-os a girar em 35°, aproximando também as hélices transmembranas. No local extracelular, EL3 é torcido abrindo uma cavidade menor para liberação de substrato (conformação voltada para fora, *outward*).

2.2.2 Glicoproteína P (P-gp)

Descoberta em 1976, a glicoproteína P foi o primeiro transportador identificado em MDR, e o mais caracterizado e reconhecido como um bom alvo para superar a resistência em câncer (WAGHRAY *et al.*, 2018). É uma glicoproteína, codificada pelo gene ABCB1, com massa molecular de 170 kDa. A primeira estrutura tridimensional de P-gp determinada em 2009 foi de camundongo, que apresentam 87% da identidade de aminoácidos com a P-gp humana (ALLER *et al.*, 2009). Atualmente, existem outras 9 estruturas de P-gp, incluindo humana (KIM; CHEN, 2018). Diferentemente de ABCG2, a estrutura tridimensional de P-gp é assimétrica, com dois NBDs e dois TMDs, sendo cada TMD consistindo de 6 alfa-hélices (MOLLAZADEH *et al.*, 2018) (Figura 3). Sua estrutura flexível é responsável pelos movimentos translacionais e rotacionais durante o mecanismo de efluxo, incluindo também a variação simultânea na distância NBD (MOLLAZADEH *et al.*, 2018). Essa flexibilidade estrutural do transportador é demonstrada pela diversidade de conformações em que a estrutura da P-gp foi resolvida, uma propriedade associada à sua poliespecificidade (ESSER *et al.*, 2017).

FIGURA 4 - Representação estrutural da glicoproteína P humana em uma conformação voltada para dentro



FONTE: Adaptado de BONITO *et al.*, 2020

LEGENDA: As 12 alfa-hélices transmembranas (TM) são divididas em dois domínios transmembranas (TMD1; laranja e TMD2; verde), sendo fisicamente ligadas ao respectivo domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) por TM6 ao NBD1 e TM12 ao NBD2 e também por interações não-covalentes envolvendo alfa-hélices curtas de acoplamento intracelular: ICH1 (roxo)/ICH4 (azul) com NBD1 e ICH2 (cinza)/ICH3 (marrom) com NBD2.

A expressão de Pg-P foi observada em mais de 50% das linhagens de células tumorais NCI-60, incluindo todos os melanomas e tumores do sistema nervoso central, e em altos níveis em carcinomas renais e de cólon (ALVAREZ *et al.*, 1995; SZAKA'CS *et al.*, 2004). Quando elevada, a expressão de Pg-P em células cancerosas, está relacionada a baixa eficácia da quimioterapia, levando a resultados clínicos ruins (WAGHRAY *et al.*, 2018). Por estar frequentemente relacionada a MDR em casos clínicos de tumores resistentes a quimioterapia, como: leucemia, rim, cólon, adrenocortical, hepatocelular, mama, ovário e pulmão, a Pg-P é muito importante e de grande interesse de estudo.

2.3 REVERSÃO DA MDR EM CÂNCER PELA INIBIÇÃO DE TRANSPORTADORES ABC

O método mais simples e direto para reverter à resistência causada pelos transportadores ABC é bloquear o transporte de substratos através do uso de inibidores. Algumas características são cruciais para o desenvolvimento de novos inibidores, como: (i) alta afinidade pelo transportador, permitindo o uso de baixas concentrações, (ii) especificidade para apenas um transportador, (iii) ausência de interação farmacocinética com os quimioterápicos, (iv) não ser transportado e (v) baixa toxicidade (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Alguns autores questionam o uso clínico de inibidores dos transportadores ABC devido a suas importantes funções fisiológicas (ROBERT; JARRY, 2003). Como normalmente as funções fisiológicas de um transportador ABC também são realizadas por outros transportadores da mesma família, o bloqueio de um único transportador específico envolvido diretamente com a resistência ao quimioterápico não comprometeria as funções fisiológicas normais dos outros transportadores. Por isso a identificação de inibidores específicos para cada transportador torna-se extremamente importante (ROBERT; JARRY, 2003).

A utilização de inibidores para a proteína P-gp já está em fase clínica. Os inibidores da P-gp são divididos em três gerações. A 1ª geração de inibidores foram

drogas aprovadas pelo FDA, como o verapamil, quinidina e ciclosporina A (LIST *et al.*, 2001). Esses inibidores apresentaram bons resultados *in vitro*, e na clínica foi observada uma baixa eficácia, os resultados ainda foram considerados promissores. Essa baixa eficácia ocorreu pela impossibilidade de aumentar as doses requeridas para bloquear o transporte, pois essas drogas possuem outros alvos celulares em concentrações menores, levando a efeitos adversos (TAMAKI *et al.*, 2011). Para contornar esses efeitos surgiram os inibidores de 2º geração, com uma maior afinidade por P-gp e com menos efeitos colaterais. Desta 2º geração pode-se destacar os medicamentos elacridar (GF120918), valspodar (PSC-833) e o biricodar (VX-710). Infelizmente, estes inibidores interferiram com a biodisponibilidade dos quimioterápicos por inibirem enzimas do citocromo P450, acarretando na interrupção dos testes clínicos (KOLITZ *et al.*, 2004). A 3º geração de inibidores conseguiu contornar alguns dos problemas anteriores, sendo descritos como inibidores potentes, não tóxicos e sem interação farmacocinética com o quimioterápico. Esses inibidores começaram a ser testados a partir de 2007 e os exemplos desta classe são o tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R1011933), CBT-1 e dofequidar (MS-209) (CRIPE *et al.*, 2010; SAEKI *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados não foram os esperados e na maioria dos casos, o grupo tratado com um inibidor da P-gp não apresentou diferença do grupo placebo. Isso levantou opiniões divergentes acerca da utilização de inibidores dos transportadores ABC. Entretanto, os pesquisadores da área ainda acreditam na estratégia e questionam os ensaios clínicos realizados até o momento, principalmente porque o nível de expressão da P-gp não foi monitorado, nem a presença de outros transportadores, como ABCG2 e MRP1. Assim, provavelmente os resultados não foram os esperados pois a redução intracelular do quimioterápico ocorreu mediada por outros transportadores (TAMAKI *et al.*, 2011). Uma vez que ABCG2 está superexpresso na maioria dos pacientes que também apresentam níveis elevados de P-gp, surge a grande necessidade de identificar inibidores específicos de ABCG2 para serem utilizados em combinação com inibidores da P-gp em futuros ensaios clínicos (ROBEY *et al.*, 2018).

2.3.1 Uso de inibidores de ABCG2

Os inibidores de ABCG2 podem ser divididos em dois tipos: inibidores específicos, como a Fumitremorgin C (FTC) ou inibidores não específicos, como o

GF120918, que inibe tanto ABCG2 quanto P-gp. O primeiro inibidor específico de ABCG2 identificado foi o FTC, isolado de *Aspergillus fumigatus*, sendo capaz de inibir o transporte de Mitoxantrona, Doxorubicina e Topotecano em células S1-M1-3.2 e MCF7/ABCG2 (TOYODA; TAKADA; SUZUKI, 2019). Entretanto, o FTC mostrou-se neurotóxico, provocando tremores e convulsões em camundongos, o que impossibilitou a continuação dos testes em ensaios clínicos (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Novos inibidores de ABCG2 surgiram, como é o caso do Ko143, um análogo do FTC que apresenta a vantagem de ser menos citotóxico. Contudo, o Ko143 não é completamente seletivo para ABCG2, apesar de possuir maior afinidade pelo transportador ABCG2 quando comparado a P-gp e MRP1 (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). Por estar comercialmente disponível, o Ko143 é um dos inibidores de ABCG2 mais utilizados em modelos celulares. Também foi demonstrado que além de bloquear o transporte de substratos, o Ko143 é capaz de inibir a atividade ATPase de ABCG2 (ALLEN *et al.*, 2002).

Várias outras classes de inibidores de ABCG2 já foram descritas na literatura. Recentemente foram identificadas algumas chalconas como potentes e seletivos inibidores de ABCG2, permitindo obter importantes informações sobre características estruturais para a inibição de ABCG2 e também sobre a citotoxicidade dessa classe de compostos (VALDAMERI *et al.*, 2012a). Até o momento não existe um candidato ideal para ensaios clínicos, porém o MBL-II-141 (Cromona 6g) hoje se apresenta como o melhor inibidor de ABCG2 descrito na literatura, cumprindo vários pré-requisitos de um inibidor em potencial (VALDAMERI *et al.*, 2012b). Os resultados obtidos com os estilbenos permitiram identificar diferentes sítios de ligação em ABCG2. Apesar dos estilbenos não inibirem completamente o transporte de substratos em ABCG2, foi possível explorar essa característica de maneira positiva, podendo comprovar pelo ensaio de bi-modulação o efeito aditivo do uso de dois inibidores de ABCG2. Os efeitos diferenciais obtidos pelo GF120918 *versus* Estilbeno 9 permitiram compreender melhor o mecanismo de inibição de ABCG2, até então muito pouco explorado (VALDAMERI *et al.*, 2012c).

Ainda não existem dados clínicos do uso de inibidores de ABCG2. Também se sabe da necessidade de melhorar os testes clínicos utilizando inibidores dos transportadores ABC para validar a estratégia. O ideal seria identificar em cada paciente qual tipo de transportador está envolvido com a resistência, monitorar a

expressão do mesmo e fazer um estudo comparativo com o uso do inibidor *versus* placebo, para posteriormente confirmar as especulações hoje existentes. Testes clínicos são muito mais complexos que os estudos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Para ABCG2 ainda não existem excelentes inibidores com potencial de uso clínico como no caso da P-gp, tornando-se de extrema importância identificar inibidores que não apresentem citotoxicidade, não sejam transportados, apresentem uma alta afinidade e ainda sejam seletivos para esse transportador.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE DROGAS (*drug delivery*) BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS

Apesar da capacidade de diversos compostos inibirem efetivamente o transportador ABCG2, assim como os inibidores de P-gp, suas propriedades físico-químicas de hidrofobicidade e baixa solubilidade em água dificultariam o desenvolvimento de um medicamento bem-sucedido. Os medicamentos com baixa solubilidade em água possuem vários problemas de entrega, incluindo limitada biodisponibilidade após a ingestão oral, menor capacidade de difusão na membrana externa e exigem mais quantidade para aplicação intravenosa (PATRA *et al.*, 2018). Entretanto, essas limitações podem ser superadas pela aplicação de sistemas de nanopartículas, como lipossomas (LI *et al.*, 2017), microemulsões (QU *et al.*, 2017), micelas (QU *et al.*, 2019) e vesículas extracelulares (VEs) (DIAYE; OREFICE; GHEZZI, 2022). Entre esses, o mais antigo e estudado são os lipossomas. Os lipossomas são compostos por uma bicamada lipídica biocompatível, que pode acomodar drogas hidrofóbicas, e uma fase aquosa interna na qual as drogas hidrofílicas podem ser capturadas (KOOG; GANDEK; NAGELKERKE, 2022). A primeira formulação lipossomal do mercado, o Doxil[®], foi aprovado pelo FDA em 1995 como sistema de liberação de doxorrubicina (BARENHOLZ, 2012).

As VEs são formas complexas de lipossomas, com a grande vantagem de serem de origem biológica, a fim de evitar as reações de hipersensibilidade associadas ao uso de sistemas sintéticos. Todas as células liberam VEs, mas o número, composição e características físico-químicas variam. Elas são liberadas de células viáveis como exossomos e microvesículas (Fig. 4), de forma constitutiva ou em resposta a determinados estímulos. As invaginações de endossomos formam corpos multivesiculares dos quais, ao se fundirem com a membrana celular, são

liberadas vesículas intraluminais, a partir desse momento denominadas exossomos. O tamanho dessas vesículas é de 30 a 150 nm. O brotamento da membrana celular leva à liberação de vesículas conhecidas como microvesículas. O tamanho dessas vesículas é de 50 a 1.000 nm de diâmetro (JONG *et al.*, 2019; KOOG; GANDEK; NAGELKERKE, 2022). Devido à dificuldade na separação das populações de exossomos e microvesículas, no geral, ambas as partículas são referidas como o termo genérico de VEs.

Fisiologicamente, VEs desempenham um papel importante na comunicação intercelular através da transferência de carga biológica como proteínas, fatores de transcrição, oncogenes, RNAs reguladores não codificantes como microRNAs (miRNAs), mRNAs, lipídios e fosfolipídios, e partículas infecciosas em células receptoras (BIEDLER; RIEHM, 1970; DANO, 1973; GOLDSTEIN; SLOTNICK; JOURNEY, 1960; GROS *et al.*, 1986; JULIANO; LING, 1976; RONINSON *et al.*, 1986). Cientificamente, VEs tem ganhado atenção desde a descoberta de que elas transferem mRNAs e miRNAs do doador para as células receptoras induzindo alterações funcionais (VALADI *et al.*, 2007). Além do conteúdo ou carga fisiológica, VEs, sobretudo exossomos, tem sido explorados como veículo de entrega de ácidos nucléicos exógenos e pequenas moléculas (JONG *et al.*, 2019). Por exemplo, doxorrubicina (TIAN *et al.*, 2014), paclitaxel (KIMA *et al.*, 2016) e curcumina (SUN *et al.*, 2010) foram incorporadas em exossomos liberados de células em cultura para tratar resistência em câncer e doenças inflamatórias em animais. Existem, pelo menos, três exemplos na literatura da utilização de VEs em ensaios de fase clínica I. Antígenos associados a melanoma (MAGE) foram incorporados em exossomos autólogos liberados de células dendríticas em pacientes com câncer de pulmão (MORSE *et al.*, 2005) e melanoma (ESCUDIER *et al.*, 2005), como estratégia de imunoterapia para eliciar resposta imune. A imunoterapia de pacientes com câncer de colorretal utilizando exossomos derivados de ascite autóloga com GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) foi eficiente na indução de imunidade antitumoral (DAI *et al.*, 2008). Os resultados foram promissores, com baixa toxicidade e resposta inflamatória branda.

Para a utilização de VEs como sistema de liberação de drogas é importante entender sua via de captação e rota intracelular nas células. A captação das VEs pode depender de uma variedade de mecanismos endocíticos, como macropinocitose, captação mediada por clatrina, ou captação independente de clatrina, dependendo do

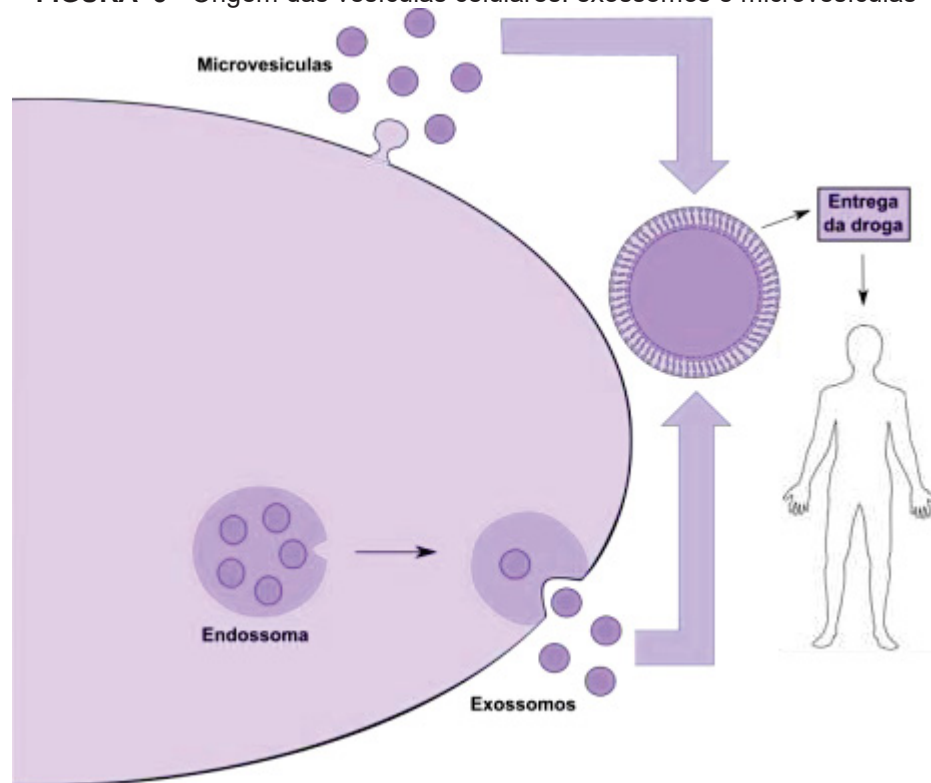
tipo de célula doadora de EV e do tipo de célula receptora (VERDERA *et al.*, 2017). A especificidade da célula-alvo pode ser determinada pelas interações específicas entre proteínas enriquecidas na superfície de VEs e os receptores na membrana plasmática das células receptoras, além do que, a célula receptora também pode ser a própria célula produtora (resposta autócrina) (MATSUMOTO *et al.*, 2017; NIEL; ANGELO; RAPOSO, 2018). Os componentes da matriz extracelular, as tetraspaninas, integrinas, lipídeos, lectinas e proteoglicanos de sulfato de heparan são alguns dos conhecidos mediadores dessas interações (NIEL; ANGELO; RAPOSO, 2018). Por exemplo, análises proteômicas mostraram que flotilina-1, proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSC70/HSP73, HSP70/HSP72) e proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II estão presentes em todas as VEs e diferentes tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 e CD82) são altamente presentes em exossomos (KOWAL *et al.*, 2016). A integração multivalente de proteínas específicas na superfície das VEs direciona o processo de internalização. A internalização das VEs leva à entrega de carga ou conteúdo endocitada pela via de degradação endossomal-lisossomal. Apesar da grande quantidade de evidências de que os VEs são capazes de entregar sua carga de maneira funcional (por exemplo, para o citosol de células-alvo no caso de miRNA ou mRNA), os mecanismos subjacentes ao escape endossomal e/ou transporte ativo de carga da VE para fora dos endossomos ainda precisam ser elucidados (VERDERA *et al.*, 2017).

As VEs estão presentes em diversos tecidos e fluidos (plasma/soro, urina, leite materno, sêmen, líquido amniótico, saliva, ascite), e uma das fontes mais estudadas é o sangue (CABY *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2011; KELLER *et al.*, 2007; KIM; LEE; GHOSH, 2017; OGAWA *et al.*, 2008; UTLEG *et al.*, 2003; YONG *et al.*, 2019). Além das VEs secretadas pelas células sanguíneas, VEs de diversas origens estão presentes na corrente sanguínea, as chamadas VEs circulantes (ALBERRO; IPARRAGUIRRE; FERNANDES, 2021). Essas VEs são, portanto, constituintes endógenos. VEs circulantes são relativamente fáceis de obter com amostras minimamente invasivas. Adicionalmente, o processo de microvesiculação pode ser induzido. Esse processo não está completamente esclarecido, entretanto, estudos indicam que a elevação na concentração de cálcio citoplasmático associado ao deslocamento do equilíbrio na simetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática desempenha papel fundamental nesse processo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). A elevação do íon Ca^{2+} promove ativação das enzimas escramblase, calpaína e

gelsolina, a primeira desempenhando papel no transporte de fosfolipídeos e as duas últimas relacionadas com alterações no citoesqueleto e clivagem de filamentos de actina. Concomitante a esses processos, ocorre inativação de translocases que mantêm os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina voltados para a camada interna (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009). Esse processo leva a formação de microvesículas estruturalmente caracterizadas por uma bicamada lipídica constituída por esfingomielinina, fosfatidilserina e outros fosfolipídios. Intercalados com esses fosfolipídeos temos proteínas de membrana, de adesão e colesterol (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Várias evidências na literatura sugerem que VEs produzidas por células sanguíneas, tanto eritrócitos (glóbulos vermelhos), quanto monócitos, granulócitos e plaquetas (além de células endoteliais), podem ser utilizadas como sistema de liberação de drogas (CHIANGJONG; NETSIRISAWAN; HONGENG, 2021). Entretanto, as fontes celulares atuais para a produção de VE são limitadas em disponibilidade e segurança em termos de transferência horizontal de genes. Nesse sentido, as VEs de eritrócitos teriam uma vantagem por serem desprovidos de DNA e por estarem prontamente disponíveis em bancos de sangue (CHIANGJONG; NETSIRISAWAN; HONGENG, 2021; USMAN *et al.*, 2018). Embora os estudos tenham como foco a liberação de RNA (USMAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), exemplos de estudos *in vitro* e *in vivo* de VEs do sangue projetados para entregarem drogas como dopamina (QU *et al.*, 2018) e peptídeo terapêutico BAY55-9837 (ZHUANG *et al.*, 2019) estão disponíveis. Diferentemente dos outros exemplos na literatura que utilizaram soro de camundongos, Zhuang e cols (2019) utilizaram soro humano comercial para isolamento dos exossomos funcionalizados para incorporação do peptídeo polar BAY55-9837, que tem como alvo as ilhotas pancreáticas de camundongos a fim de aumentar a secreção de insulina (ZHUANG *et al.*, 2019). Dada a sua comprovada alta captação e baixa toxicidade, VEs são promissoras alternativas como sistema de liberação de drogas.

FIGURA 5 - Origem das vesículas celulares: exossomos e microvesículas



FONTE:O autor (2022).

REFERÊNCIAS

- ALBERRO, Ainhoa; IPARRAGUIRRE, Leire; FERNANDES, Adelaide. Extracellular Vesicles in Blood : Sources , Effects , and Applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22158163>
- ALLEN, John D. *et al.* Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C 1. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. April, p. 417–425, 2002.
- ALLER, Stephen G. *et al.* Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly- Specific Drug Binding. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1718–1722, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1168750>. Structure
- ALLIKMETS, Rando *et al.* A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 58, n. 23, p. 5337–5339, 1998.
- ALVAREZ, Manuel *et al.* Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. **The journal of clinical Investigation**, p. 2205–2214, 1995.
- AMBUDKAR, Suresh V. *et al.* P-glycoprotein: From genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, n. 47 REV. ISS. 6, p. 7468–7485, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948>
- AUST, Sylvia *et al.* Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 8, p. 1024–1036, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700127>
- BALÁZS SARKADI, LÁSZLÓ HOMOLYA, Tamás Hegedüs. The ABCG2 / BCRP transporter and its variants – from structure to pathology. **FEBS Letters**, v. 594, p. 4012–4034, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13947>
- BARENHOLZ, Yechezkel Chezy. Doxil ® — The first FDA-approved nano-drug : Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
- BARTHOLOMAE, Stephan *et al.* Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 5, p. 22–247, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pbc>
- BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. **Cancer Research**, v. 30, n. 4, p. 1174–1184, 1970.
- BONITO, Cátia A. *et al.* Theoretical insights on helix repacking as the origin of P-glycoprotein promiscuity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 9823, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66587-5>
- BORST, P.; ELFERINK, R. Oude. M AMMALIAN ABC TRANSPORTERS AND DISEASE. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 537–592, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
- BOUMENDJEL, A. *et al.* Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors : In Vitro Optimization and In Vivo Validation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3387–3401, 2011.
- BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, 2020.
- CABY, Marie-pierre *et al.* Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma.

- v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
 CHIANGJONG, Wararat; NETSIRISAWAN, Pukkavadee; HONGENG, Suradej. Red Blood Cell Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery : Challenges and Opportunities. v. 8, n. December, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.761362>
- CHOI, YOUNG HEE; YU, Ai-Ming. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development Young. **Curr Pharm Des.**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2014. Disponível em: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
- CHOI, Dong-Sic *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. **Proteomics**, v. 11, p. 2745–2751, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201100022>
- COCUCCI, Emanuele; RACCHETTI, Gabriella; MELDOLESI, Jacopo. Shedding microvesicles : artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, n. January, p. 43–51, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- COLE, S. P. C. *et al.* Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. **SCIENCE** *, v. 258, n. 1992, 1992.
- CRIFE, Larry D. *et al.* Zosuquidar , a novel modulator of P-glycoprotein , does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia : a randomized , placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. **BLOOD**, v. 116, n. 20, p. 4077–4085, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-277269>.An
- DAI, Shengming *et al.* Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 4, p. 782–790, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.1>
- DALLAVALLE, Sabrina *et al.* Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. **Drug Resistance Updates**, v. 50, n. February, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100682>
- DANO, KELD. ACTIVE OUTWARD TRANSPORT OF DAUNOMYCIN IN RESISTANT EHRlich ASCITES TUMOR CELLS. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 323, p. 466–483, 1973.
- DASSA, Elie; BOUIGE, Philippe. The ABC of ABCs : a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 211–229, 2001.
- DE LANGE, Elizabeth C. M. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 12, p. 1793–1809, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.009>
- DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 7, p. 1007–1017, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- DIAYE, Elisa-racky N.; OREFICE, Nicola Salvatore; GHEZZI, Catherine. Chemically Modified Extracellular Vesicles and Applications in Radiolabeling and Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1–15, 2022.
- DOUGLAS C. REES, ERIC JOHNSON, and Oded Lewinson. ABC transporters : The power to change. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 218–227, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2646>.ABC
- DOYLE, L. Austin *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells (mitoxantroneanthracycline transporter proteins). **Medical Sciences**, v. 95, n. December, p. 15665–15670, 1998.

- ECKENSTALER, Robert; BENNDORF, Ralf A. 3D structure of the transporter ABCG2 — What ' s new ? **Br J Pharmaco**, v. 177, p. 1485–1496, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.14991>
- ESCUDIER, Bernard *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes : results of the first phase I clinical trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1–13, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10>
- ESSER, Lothar *et al.* Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Edited by Norma Allewell. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 292, n. 2, p. 446–461, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755884>
- Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
- FETSCH, Patricia A. *et al.* Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. **Cancer Letters**, v. 235, n. 1, p. 84–92, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.024>
- GLOBOCAN. **CANCER FACT SHEETS**. 2020.
- GOLDSTEIN, Milton N.; SLOTNICK, Irving J.; JOURNEY, L. J. IN VITRO STUDIES WITH HELA CELL LINES SENSITIVE AND RESISTANT TO ACTINOMYCIN D. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 474–483, 1960.
- GOTTESMAN, Michael M. MECHANISMS OF CANCER DRUG RESISTANCE. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 615–27, 2002.
- GOTTESMAN, Michael M.; LING, Victor. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. **FEBS Letters**, v. 580, n. 4, p. 998–1009, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.060>
- GROS, P. *et al.* Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 2, p. 337–341, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.337>
- HULS, M. *et al.* The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. **Kidney International**, v. 73, n. 2, p. 220–225, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002645>
- JONG, Olivier G. de *et al.* Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. **Acc. Chem. Res.**, v. 52, p. 1761–1770, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00109>
- JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **BBA - Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152–162, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
- KELLER, S. *et al.* CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney International**, v. 72, n. 9, p. 1095–1102, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>
- KIM, Oh Youn; LEE, Jaewook; GHO, Yong Song. Extracellular vesicle mimetics: Novel alternatives to extracellular vesicle-based theranostics, drug delivery, and vaccines. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 67, p. 74–82, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.12.001>
- KIM, Youngjin; CHEN, Jue. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound , outward-facing conformation. **Science**, v. 7389, n. January, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aar7389>

- KIMA, Myung Soo *et al.* Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 655–664, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- KOLITZ, Jonathan E. *et al.* Dose Escalation Studies of Cytarabine, Daunorubicin, and Etoposide With and Without Multidrug Resistance Modulation With PSC-833 in Untreated Adults With Acute Myeloid Leukemia Younger Than 60 Years: Final Induction Results of Cancer and Leukemia Group B S. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 22, n. 21, p. 4290–4301, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.106>
- KOOG, Luke Van Der; GANDEK, Timea B.; NAGELKERKE, Anika. Liposomes and Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems : A Comparison of Composition , Pharmacokinetics , and Functionalization. **Adv. Healthcare Mater**, v. 2100639, n. 2100639, p. 1–32, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adhm.202100639>
- KOWAL, Joanna *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **PNAS**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- LI, Yang *et al.* Mucus interactions with liposomes encapsulating bioactives : Interfacial tensiometry and cellular uptake on Caco-2 and cocultures of Caco-2 / HT29-MTX. **Food Research International**, v. 92, p. 128–137, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.010>
- LIST, Alan F. *et al.* Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia : a Southwest Oncology Group study. **Blood**, v. 98, n. 12, p. 3212–3220, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V98.12.3212>
- LUQMANI, Y. A. Mechanisms of Drug Resistance in. **Med Princ Pract**, v. 14, n. suppl 1, p. 35–48, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000086183>
- MALIEPAARD, Marc *et al.* Subcellular localization and distribution of the Breast Resistance Protein Transporter in normal human tissues. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3458–3464, 2001.
- MARZAC, Christophe *et al.* ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: Transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. **Haematologica**, v. 96, n. 9, p. 1293–1301, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031823>
- MATSUMOTO, Akihiro *et al.* Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by. **Cancer Science**, v. 108, n. 9, p. 1803–1810, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cas.13310>
- MIRSKI, SHELAGH E. L., GERLACH, JAMES H., COLE, Susan P. C. Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. **Cancer Research**, v. 47, n. 10, p. 2594–2598, 1987.
- MIYAKE, Keisuke *et al.* Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 1999.
- MO, Wei; ZHANG, Jian Ting. Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–27, 2012.
- MOLLAZADEH, Shirin *et al.* Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. **Life Sciences**, v. 214, n. September, p. 118–123, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>

- MORSE, Michael A. *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1–8, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-9>
- NIEL, Guillaume Van; ANGELO, Gisela D.; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Publishing Group**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- OGAWA, Yuko *et al.* Exosome-Like Vesicles with Dipeptidyl Peptidase IV in Human Saliva. **Biol. Pharm. Bull**, v. 31, n. 6, p. 1059–1062, 2008.
- P KANNAN, C JOHN, SS ZOGHBI, C HALLDIN, MM GOTTESMAN, RB INNIS, MD Hall. Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 86, n. 4, p. 368–377, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.138>
- PATEL, Chirayu *et al.* Multidrug resistance in relapsed AML: Evidence of biological heterogeneity. **Cancer**, v. 119, n. 16, p. 3076–3083, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.28098>
- PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems : recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- QU, Ding *et al.* Oral Nanomedicine Based on Multicomponent Microemulsions for Drug-Resistant Breast Cancer Treatment. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 1268–1280, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00011>
- QU, Guowei *et al.* Self-assembled micelles based on N -octyl- N ' -phthalyl- O -phosphoryl chitosan derivative as an effective oral carrier of paclitaxel. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, n. November 2018, p. 428–439, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.099>
- QU, Mengke *et al.* Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson ' s disease. **Journal of Controlled Release**, v. 287, n. August, p. 156–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.035>
- RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles : Exosomes , microvesicles , and friends. **J. Cell Biol.**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- ROBERT, Jacques; JARRY, Christian. Multidrug Resistance Reversal Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 23, p. 4805–4817, 2003.
- ROBEY, Robert W. *et al.* **Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer**. v. 18, n. 7, p. 452-464, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
- ROCCHI, Emmanuelle *et al.* The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, n. 1, p. 42–46, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2590>
- RONINSON, I. B. *et al.* Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4538–4542, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4538>
- SAEKI, Toshiaki *et al.* Dofequidar Fumarate (MS-209) in Combination With Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Fluorouracil for Patients With Advanced or Recurrent Breast Cancer. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 25, n. 4, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1646>
- SRIKANT, Sriram; GAUDET, Rachelle; BIOLOGY, Cellular. Mechanics and

- Pharmacology of Substrate Selection and Transport by Eukaryotic ABC Exporters. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 26, n. 9, p. 792–801, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0280-4>.Mechanics
- SUN, Dongmei *et al.* A Novel Nanoparticle Drug Delivery System : The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 9, p. 1606–1614, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>
- SZAKÁCS, Gergely *et al.* Predicting drug sensitivity and resistance : Profiling ABC transporter genes in cancer cells. **CANCER CELL**, v. 6, n. August, p. 129–137, 2004.
- SZAKÁCS, Gergely *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1984>
- TAMAKI, Akina *et al.* The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays Biochem**, v. 50, n. 1, p. 209–232, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bse0500209>.The
- TIAN, Yanhua *et al.* Biomaterials A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2383–2390, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
- TOYODA, Yu; TAKADA, Tappei; SUZUKI, Hiroshi. Inhibitors of Human ABCG2 : From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. **Front. Pharmacol.**, v. 10, n. March, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00208>
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER) in vitro metabolism- and transporter- mediated drug- drug: interaction studies guidance for industry.** 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/>.
- UEDA, Kazumitsu *et al.* The mdrl gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, n. 3, p. 956–962, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80136-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80136-X)
- USMAN, Waqas Muhammad *et al.* Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. **Nature Communications**, v. 9, p. 2359, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04791-8>
- UTLEG, Angelita G. *et al.* Proteomic Analysis of Human Prostatomes. v. 161, n. January, p. 150–161, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pros.10255>
- VALADI, Hadi *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **NATURE CELL BIOLOGY**, v. 9, n. 6, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- VALDAMERI, Glaucio *et al.* Investigation of Chalcones as Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein: Critical Role of Methoxylation in both Inhibition Potency and Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 3193–3200, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm2016528>
- VALDAMERI, Glaucio *et al.* Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 966–970, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm201404w>
- VALDAMERI, Glaucio *et al.* Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. **acs chemical biology**, v. 7, p. 322–330, 2012 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acschembio.2b00001>

Society 322 [dx.doi.org/10.1021/cb200435y](https://doi.org/10.1021/cb200435y)

VERDERA, Helena Costa *et al.* Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. **Journal of Controlled Release**, v. 266, n. July, p. 100–108, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.019>

WAGHRAY, Deepali *et al.* Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-glycoprotein in Cancer Treatment Deepali. **J Med Chem.**, v. 61, n. 12, p. 5108–5121, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01457>.Inhibit

WANG, Jinglu *et al.* Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 48, p. 84559–84571, 2017.

WANG, Xuan; ZHANG, Haiyun; CHEN, Xiaozhuo. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resist**, v. 2, p. 141–160, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

WU, Qiong *et al.* Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics : Mechanisms and lab approaches. **Cancer Letters**, v. 347, n. 2, p. 159–166, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>

YONG, Tusing *et al.* Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. **Nature Communications**, v. 10, p. 3038, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11718-4>

YU, Qin *et al.* Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism. **Nature Communications**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24651-2>

ZHANG, Gensheng *et al.* Extracellular vesicles : Natural liver-accumulating drug delivery vehicles for the treatment of liver diseases. n. October, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jev2.12030>

ZHUANG, Manjiao *et al.* SPION-Decorated Exosome Delivered BAY55-9837 Targeting the Pancreas through Magnetism to Improve the Blood GLC Response. v. 1903135, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sml.201903135>

CAPÍTULO 1

Este capítulo consiste em um artigo de revisão que foi *publicado na European Journal of Medicinal Chemistry* (DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114346). O artigo aborda os inibidores do transportador ABCG2 já identificados e as metodologias experimentais utilizadas para caracterizar os mecanismos de novos inibidores, bem como o uso potencial de inibidores de ABCG2 em células-tronco cancerígenas para melhorar a taxa de resposta objetiva e o mecanismo de moduladores de ABCG2 em níveis de expressão transcricional e proteica. Nesse artigo participei da redação do tópico “Modulators of ABCG2 expression”. A fim de permitir a compreensão desse capítulo, os tópicos do artigo *Abstract*, *Graphical Abstract*, *1-Introduction*, *7-Modulators of ABCG2 expression*, *8-Conclusion* e *9-References* estão apresentados a seguir.

Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): functional inhibitors and expression modulators

Ingrid Fatima Zattoni[#], Letícia Carani Delabio[#], Julia de Paula Dutra, Diogo Henrique Kita, Gustavo Scheiffer, Marina Hemberger, Giovana da Silva Pereira, Vivian Rotundo Moure, Glaucio Valdameri^{*}

Pharmaceutical Sciences Graduation Program, Laboratory of Cancer Drug Resistance, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

These authors contributed equally: Ingrid Fatima Zattoni and Letícia Carani Delabio.

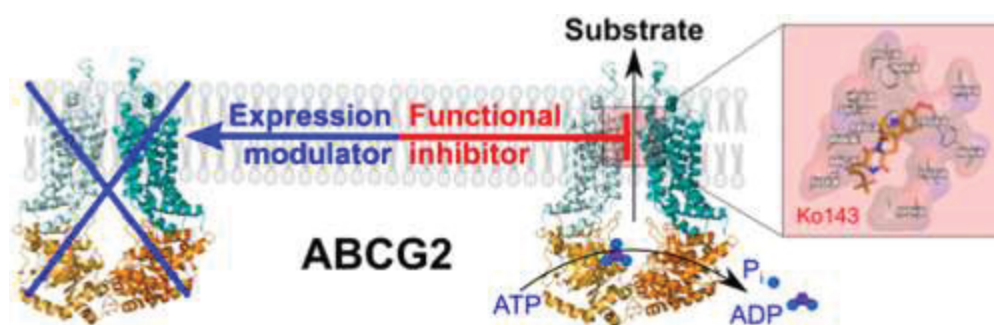
^{*}Corresponding author: Glaucio Valdameri, E-mail: gvaldameri@ufpr.br

ABSTRACT

The primary source of failure of cancer therapies is multidrug resistance (MDR), which can be caused by different mechanisms, including the overexpression of ABC transporters in cancer cells. Among the 48 human ABC proteins, the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) has been described as a pivotal player in cancer resistance. The use of functional inhibitors and expression modulators is a promising strategy to overcome the MDR caused by ABCG2. Despite the lack of clinical trials using ABCG2 inhibitors, many compounds have already been discovered. This review presents an overview about various ABCG2 inhibitors that have been identified, discussing some chemical aspects and the main experimental methods used to identify and characterize the mechanisms of new inhibitors. In addition, some biological requirements to pursue preclinical tests are described. Finally, we discuss the potential use of ABCG2 inhibitors in cancer stem cells (CSC) to improve the objective response rate and the mechanism of ABCG2 modulators at transcriptional and protein expression levels.

Keywords: ABCG2 transporter, Multidrug resistance, Cancer Stem Cells, Inhibitor, Modulator.

Graphical Abstract



1.Introduction

Multidrug resistance (MDR) is the main cause that leads to failure of cancer chemotherapy. It was recently estimated that up to 90% of cancer-related deaths are associated with MDR (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020). Different mechanisms promote the MDR phenotype, such as: apoptosis failure, activation of detoxifying systems, increased DNA repair, drug compartmentalization, changes of molecular drug targets and overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; LUQMANI, 2005b; SIMON; SCHINDLER, 1994; WU *et al.*, 2014).

The human genome contains 48 genes that encode ABC proteins, organized in seven subfamilies (ABCA-ABCG) (DEAN, 2005; DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 2001). The overexpression of ABC transporters in cancer cells is probably the most relevant MDR mechanism (GOTTESMAN; PASTAN, 1993; LUQMANI, 2005b). These transporters can export a myriad of compounds with unrelated chemical structures (substrates), leading to a decrease in intracellular drug accumulation and impairing the cell response to drug-induced cell death (MOHAMMAD; HE; YIN, 2018; ROBEY *et al.*, 2008). In addition, many ABC transporters share a physiological role by exporting xenobiotics, proteins, metabolic products and lipids in tissues like liver, gut, kidney, placenta and the blood brain barrier (HOLLAND, 2011; LINTON, 2007; MOHAMMAD; HE; YIN, 2018). Among the 48 ABC proteins, three are closely related to MDR: glycoprotein-P (P-gp/ABCB1), multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) (CHOI; YU, 2014).

P-gp was discovered in 1976 and was the first ABC transporter being identified as responsible for MDR (JULIANO; LING, 1976). This transporter is also known as multidrug resistance protein 1 (MDR1), being first described in Chinese ovary tissue culture cells resistant to colchicine with cross-resistance to other chemotherapeutics (JULIANO; LING, 1976). In 1992, the second ABC transporter associated with MDR was discovered. MRP1 was described in a doxorubicin-resistance small cell lung cancer line H69AR, a multidrug resistant variant of the human small cell lung cancer cell line NCI-H69 (COLE *et al.*, 1992). The ABCG2 transporter was identified simultaneously by three different laboratories (NATARAJAN *et al.*, 2012). It had its role in a MDR breast cancer subline (MCF-7/AdrVp) verified in 1998, receiving the name of breast cancer resistance protein (BCRP) (DOYLE *et al.*, 1998b). The overexpression of this protein was also verified in mitoxantrone resistant S1-M1-80 cells (MIYAKE *et al.*, 1999) and placenta tissue (ALLIKMETS *et al.*, 1998b).

In this review, different strategies are described regarding drug-design and development of new inhibitors of ABCG2 activity (functional inhibitors). The most useful cell- and membrane-based approaches for identification and characterization of the mechanism of inhibition, as well as *in silico* methods, are presented and discussed. The use of ABC transporter inhibitors targeting cancer stem cells (CSC) is introduced and a table of ABCG2 inhibitors indicating the IC₅₀ values is presented, as well a table containing the compounds that down-regulate the expression levels of ABCG2 (i.e. modulators of ABCG2 expression). The critical features of promising inhibitors are discussed and an overview of compounds that modulate the expression levels is presented.

7. Modulators of ABCG2 expression

Overexpression of ABCG2 occurs in drug resistant cancer cell lines (*in vitro*) as well as in a variety of clinical tumor tissues (DOYLE *et al.*, 1998b; MALIEPAARD *et al.*, 1999; SAUERBREY *et al.*, 2002; SHU *et al.*, 2021). To overcome this, an alternative strategy is to use a modulator that decreases the expression of ABCG2 in the cellular membrane. Considering that the effects of chemical compounds on the activity and expression of ABCG2 are unpredictable, a full understanding of the mechanism of a new ABCG2 inhibitor requires not only functional evaluation, but also an elucidation of molecular mechanisms underlying the regulation of ABCG2 expression.

The human *ABCG2* gene is located on chromosome 4 (4q22), covering more than 66 kb and consisting of 16 exons and 15 introns, and its translation start site is located in exon 2 and the end in exon 16 (BAILEY-DELL *et al.*, 2001; NAKANISHI; ROSS, 2012). Modulation of *ABCG2* expression can occur at transcriptional (GORCZYCA; ALEKSUNES, 2020; YOU; RICHARDSON; ALEKSUNES, 2020), posttranscriptional (AN *et al.*, 2017; HAENISCH; WERK; CASCORBI, 2014) and posttranslational levels (SARKADI; HOMOLYA; HEGEDŰS, 2020). The compounds that modulate *ABCG2* expression interfere at transcriptional and posttranslational levels; most also inhibit the transport activity (Table 3), and we herein describe their mechanism of regulation in human cell lines (Fig. 4).

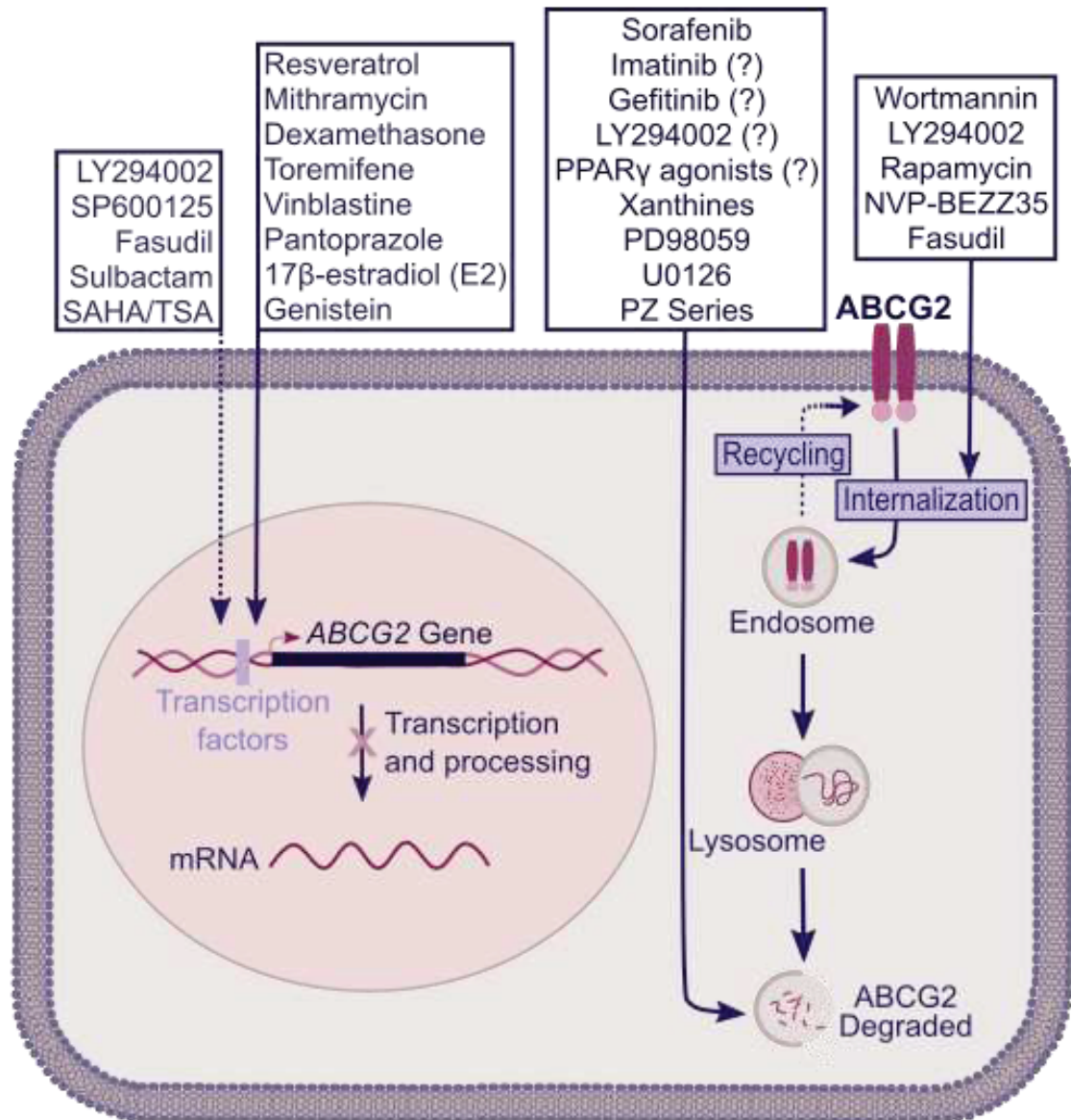


Figure 4: Proposed mechanism of action of compounds in reducing ABCG2 expression. The indicated compounds have been shown to modulate ABCG2 expression at transcriptional and posttranslational levels.

7.1 Transcriptional regulation

ABCG2 expression is regulated by a promoter at position ~312 upstream of the transcription start site (TSS) that lacks a TATA box (TATA-less). However, it contains several SP1 (specific protein 1), AP1 (activator protein 1) and AP2 sites and a CCAAT box downstream from a putative CpG island (BAILEY-DELL *et al.*, 2001), which is a potential site for epigenetic regulation by methylation (MOON; KIM; KU, 2016; TO *et al.*, 2008).

The transcriptional regulation of *ABCG2* involves several transcription factors besides SP1, AP1 and AP2, including SP3 (YANG *et al.*, 2013), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2004), nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) (SINGH *et al.*, 2010) and ligand-activated transcription factors, such as the estrogen receptors ER α and ER β (EE *et al.*, 2004), progesterone receptors (PR), mainly PR-B isoform (WANG *et al.*, 2008a), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR γ) (LIN *et al.*, 2017), aryl hydrocarbon receptor (AHR) (TOMPKINS *et al.*, 2010) and pregnane X receptor (PXR) (ALBERMANN *et al.*, 2005). Knowledge is emerging as to how these transcription factors respond to different stimuli through response elements at the *ABCG2* promoter in order to modulate *ABCG2* expression (GORCZYCA; ALEKSUNES, 2020). This review focuses on compounds that down-regulate human *ABCG2* gene expression.

Recent studies in human cancer cells revealed that the expression of the *ABCG2* gene was regulated through activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) cascades. In particular, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPK pathway, which involves the activation of ERK by MAPK/ERK kinase (MEK), has been related to down-regulation of *ABCG2* gene (IMAI *et al.*, 2009; TOMIYASU *et al.*, 2013). However, *ABCG2* gene expression was up-regulated through the MAPK/c-Jun amino-terminal kinase (JNK) pathway (TOMIYASU *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2012) and the PI3K/protein kinase B (AKT) pathway (YANG *et al.*, 2020). All these signaling pathways are upstream regulated through epidermal growth factor receptor (EGFR) stimulation. EGFR belongs to a family of transmembrane glycoproteins with a tyrosine kinase domain. In tumor cells, EGFR is activated by overexpression of the receptor and by the binding of several ligands, including EGF, growth factors and cytokines, leading to EGFR autophosphorylation and therecruiting of several cytoplasmatic proteins, which, in turn, trigger signaling pathways that regulate cell proliferation, differentiation and survival (SCALTRITI; BASELGA, 2006). The downstream effectors that regulate *ABCG2* gene expression include NRF2, mTOR, HIF-1 and PPAR for PI3K/AKT (WANG *et al.*, 2008b; ZHANG *et al.*, 2018b) and AP1 for JNK (ANGEL; KARIN, 1991). As expected, the inhibition of EGFR signaling-mediated down-regulated *ABCG2* expression, although this effect seems to be more critical in posttranslational modulation, as discussed subsequently. The inhibition of the MAPK/JNK pathway by SP600125 decreased *ABCG2* mRNA expression in human colon cancer cell line SW1116 (ZHU

et al., 2012). Moreover, the inhibition of the PI3K pathway by LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) and gefitinib (a TKI that targets the EGFR) decreased NRF2 expression and, probably as a consequence, ABCG2 protein expression in HNC cell lines (YANG *et al.*, 2020). Besides EGFR, another signaling pathway involved in ABCG2 up-regulation involves activation of Rho kinases (ROCKs) which are downstream effectors of Rho GTPases. ROCKs signaling contributes to cancer cell motility and invasion (MATSUOKA; YASHIRO, 2014). An inhibitor of ROCKs, fasudil, decreased mRNA levels of ABCG2 specifically through inhibition of the ROCK2/moesin/ β -catenin pathway in glioma cells. The inhibition of expression of ABCG2 after fasudil exposure was further confirmed *in vivo* using mouse and rat models (ZHANG *et al.*, 2018a).

Furthermore, some compounds act by direct antagonism of the transcription factors involved in ABCG2 modulation. Toremifene is an antiestrogen that competes with endogenous estrogen for ER α binding (BUZDAR; HORTOBAGYI, 1998; ZHANG *et al.*, 2010). Dexamethasone can act by binding to the PR or the PXR (HONORAT *et al.*, 2008). Mithramycin blocks the binding of SP1 through its interaction with the GC-rich motifs of the ABCG2 promoter, decreases SP1 expression and consequently down-regulates AHR and NRF2 expression, which, in turn, should contribute to ABCG2 down-regulation (YANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). Resveratrol, a known antagonist of AHR, down-regulated the ABCG2 expression in human colon cancer cell line S1 (TO *et al.*, 2011) and pancreatic CSC (SHANKAR *et al.*, 2011).

Plant alkaloids also affect ABCG2 expression. After vinblastine treatment, ABCG2 mRNA and protein levels were reduced in medulloblastoma cell line UW3 (VALERA *et al.*, 2009). Although the mRNA levels were not assessed, berberine reduced ABCG2 protein levels in MCF-7 cells (KIM *et al.*, 2008). Other natural products, such as curcumin and the active ingredient of green tea, polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG), inhibited ABCG2 protein expression in head and neck cancer (HNC) SASL90d and OECM1 cell lines, possibly through inhibition of NRF2 expression (YANG *et al.*, 2020).

Sulbactam, a β -lactamase inhibitor, negatively affected ABCG2 expression, as well as other ABC transporters in several breast cancer cell lines. In MDA-MB-468 cells, the exposure to sulbactam in combination with doxorubicin reduced both ABCG2 mRNA and protein levels. This finding is possibly due to a synergistic inhibition of overall transcription and translation processes (WEN *et al.*, 2018). Pantoprazole, a

proton pump inhibitor, led to reduced mRNA and protein levels of ABCG2 in human gastric cancer cell lines (FENG *et al.*, 2016).

However, for some compounds the effect on ABCG2 regulation is contrary to the expected physiological response. 17 β -estradiol (E2) belongs, together with estrone and estriol, to the group of sex steroids called estrogens; it is the most biologically active form and acts through ER α and ER β signaling (NILSSON *et al.*, 2001). Although 17 β -estradiol is known to induce ABCG2 expression via ER α in breast cancer MCF-7 cells [264], Wang *et al.* [265] described 17 β -estradiol as an inhibitor of ABCG2 expression in BeWo choriocarcinoma cells, probably as a consequence of decreasing the mRNA levels of ER β and PR-B. This finding was further confirmed in BeWo cells (WANG; UNADKAT; MAO, 2008). In agreement, also in BeWo cells, genistein, a soy isoflavone phytoestrogen, decreased ABCG2 mRNA (HUANG *et al.*, 2014) and protein levels, possibly via ER α signaling (BIRCSAK *et al.*, 2016). Despite the fact that histone acetylation at the promoter is a mechanism of transcriptional activation of ABCG2 (TO *et al.*, 2008) and romidepsin, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, induced ABCG2 expression in cancer cell lines via AHR signaling (TO *et al.*, 2011), the HDAC inhibitors suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA or vorinostat) and trichostatin A (TSA) down-regulated ABCG2 expression in A549 lung cancer cells, although they did not influence protein expression levels (WANG *et al.*, 2019).

Among the compound presented, 17 β -estradiol, toremifene, sulbactam, fasudil, dexamethasone, mithramycin, genistein and gefitinib showed a dual reversal mechanism of ABCG2-mediated resistance: abrogating the transporter activity and expression.

7.2 Posttranslational regulation

It has been suggested that the up-regulation of ABCG2 mRNA alone is not an indicator for MDR, based on the fact that ABCG2 has to be correctly folded and inserted into the plasma membrane to be functional (SZAKÁCS *et al.*, 2004). Therefore, compounds that reverse the overexpression of active ABCG2 at the posttranslational level are emerging as alternatives to overcome MDR.

The production of functional ABCG2 at the membrane involves several posttranslational steps such as folding, assembly and initial posttranslational modifications at the endoplasmatic reticulum (ER). Trafficking routes then drive ABCG2

from the ER to the plasma membrane, passing through the Golgi apparatus for full glycosylation, in a process that is not completely understood (for details, see the recent reviews (BARTOS; HOMOLYA, 2021; MÓZNER *et al.*, 2019; SARKADI; HOMOLYA; HEGEDŰS, 2020)). However, processing failures can occur and abnormally folded protein might be degraded to avoid loss of normal cellular functions. In general, two major proteolytic systems are responsible for membrane protein degradation in mammalian cells: the lysosomal and ubiquitin-proteasome pathways. Specifically for ABCG2, it has been suggested that ubiquitin-mediated degradation of misfolded protein occurs as a consequence of mutations or genetic polymorphisms that lead to loss of intramolecular and intermolecular disulfide bond formation (WAKABAYASHI *et al.*, 2007) and modification of N-glycosylation site, Asn596 (NAKAGAWA *et al.*, 2009), for instance. Briefly, unfolded or partially folded ABCG2 without posttranslational modifications is removed from the ER by retrotranslocation to the cytosol, becoming a substrate for ubiquitination and finally being degraded by cytoplasmatic proteasomes (KOPITO, 1997). The lysosome-mediated pathway has been involved in degradation of folded proteins. Thus, the ABCG2 transporter at the plasma membrane can be internalized, delivered through the endosomal compartment and sorted, before being either recycled back to the plasma membrane, or directed to the lysosome for degradation (MO; ZHANG, 2012a; SARKADI; HOMOLYA; HEGEDŰS, 2020). Multiple stimuli accelerate ABCG2 internalization, including oxidative stress (ERDEI *et al.*, 2013; KOMORI; YAMADA; TAMAI, 2018), conformational changes in the intracellular ABCG2 protein upon 5D3 antibody binding (STUDZIAN; BARTOSZ; PULASKI, 2015) and the exposure to some compounds, as discussed subsequently (Table 3).

Table 3 - Modulators of ABCG2 expression levels

Compound	Mechanism of regulation	Methods	<i>In vitro</i> assay	<i>In vivo</i> assay	Functional inhibitor	Reference
PZ-series (PZ-39, 8, 34 and 38)	Posttranslational	Western blot, 5D3-flow cytometry, Immunoprecipitation, RT-PCR	MCF7, MCF7/AdVp3000, HEK293/Vector, HEK293/ABCG2	-	Yes	(PENG <i>et al.</i> , 2009, 2010)
berberine	-	Flow cytometry	MCF-7, MDA-MB-231	-	-	(KIM <i>et al.</i> , 2008)
17 β -estradiol (E2)	Transcriptional	Western blot, RT-qPCR	Human placental BeWo	-	Yes	(WANG <i>et al.</i> , 2006a)
17 β -estradiol (E2)	Posttranscriptional	RT-PCR, Western blot, Northern Blot	MCF-7, T-47D, A549, MCF-7 / BCRP, T-47D / BCRP	-	Yes	(IMAI <i>et al.</i> , 2005)
17 β -estradiol (E2)	Posttranslational	Western blot Immunofluorescence	Rat brain capillaries	Mice	-	

		Immunoblotting				(HARTZ <i>et al.</i> , 2010)
toremifene	Transcriptional	RT-PCR, Western blot	MCF-7, MCF-7 / P-BCRP	-	Yes	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
sulbactam	Transcriptional	RT-qPCR and proteome analysis using gel-LC-MS / MS	MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MCF-7, BT474, T-47D, MCF-10A	-	Yes	(WEN <i>et al.</i> , 2018)
vinblastine	Transcriptional	RT-qPCR, Immunohistochemistry	UW3	-	-	(VALERA <i>et al.</i> , 2009)
suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or vorinostat and trichostatin A (TSA) (HDAC inhibitors)	Transcriptional	qRT-PCR, Western Blot	A549	-	-	(WANG <i>et al.</i> , 2019)
fasudil	Transcriptional and posttranslational	qRT-PCR, Western blot, immunoprecipitation	U87, U251, T5, T6 e rG-1 (glioma cells)	Mice (U251R cells) and rats (C6R cells)	Yes	(ZHANG <i>et al.</i> , 2018a)
sorafenib	Posttranslational	Western blot, RT-qPCR	K562, K562 / A02, HEK293 / Vec, HEK293 / ABCG2, MCF-7, MCF-7 / MX	-	Yes	(WEI <i>et al.</i> , 2012)
imatinib	Posttranslational	Western blot, 5D3-flow cytometry	K562/BCRP	-	yes	(NAKANIS HI <i>et al.</i> , 2006)
imatinib	Posttranslational	Western blot, 5D3-flow cytometry	K562/ABCG2	-	Yes	(DOHSE <i>et al.</i> , 2010)
nilotinib	Posttranslational	5D3-flow cytometry	K562/ABCG2	-	Yes	(DOHSE <i>et al.</i> , 2010)
dasatinib	Posttranslational	5D3-flow cytometry	K562/ABCG2	-	Yes	(DOHSE <i>et al.</i> , 2010)
mithramycin	Transcriptional	RT-qPCR, Western-blot	A549, A549 / shRNA-Sp1, A549 / shRNA-Sp3, A549 / pLKO.1	-	Yes	(ZHANG <i>et al.</i> , 2012)
dexamethasone	Transcriptional	qRT-PCR Western blot	MCF-7, ABC28, CTC15	-	Yes	(HONORAT <i>et al.</i> , 2008)
genistein	Transcriptional	RT-qPCR, western blot	MGC-803, Human placental BeWo		Yes	(BIRCSAK <i>et al.</i> , 2016; HUANG <i>et al.</i> , 2014)
resveratrol	Transcriptional	RT-qPCR	Human colon cancer cell line S1 Pancreatic cancer stem cells	-	-	(SHANKAR <i>et al.</i> , 2011; TO <i>et al.</i> , 2011)
pantoprazole	Transcriptional	RT-qPCR, western blot	Gastric CSC	-	-	(FENG <i>et al.</i> , 2016)
curcumin	Transcriptional (?)	Western blot, flow cytometry	Head and neck cancer cell lines OECM1 and SAS	-	-	(YANG <i>et al.</i> , 2020)

epigallocatechin gallate (EGCG)	Transcriptional (?)	Western blot, flow cytometry	Head and neck cancer cell lines OECM1 and SAS	-	-	(YANG <i>et al.</i> , 2020)
gefitinib	Transcriptional and posttranslational (?)	Western blot, flow cytometry	Head and neck cancer cell lines OECM1 and SAS	-	-	(YANG <i>et al.</i> , 2020)
wortmannin	Posttranslational	Indirect immunofluorescence	gallbladder epithelial cells	-	-	(AUST <i>et al.</i> , 2004b)
LY294002 (PIK3 inhibitor)	Transcriptional and posttranslational (?)	Western blot	Head and neck cancer cell lines OECM1 and SAS	-	-	(YANG <i>et al.</i> , 2020)
LY294002 (PIK3 inhibitor)	Posttranslational	RT-qPCR, western blot, immunofluorescence	glioma tumor stem-like cells	-	yes	(BLEAU <i>et al.</i> , 2009)
LY294002 (PIK3 inhibitor)	Posttranslational	Western blot, immunofluorescence	MHCC-97L SP cells	-	yes	(HU <i>et al.</i> , 2008)
LY294002 (PIK3 inhibitor)	Posttranslational	Western blot	K562/BCRP	-	-	(NAKANIS HI <i>et al.</i> , 2006)
rapamycin (mTOR inhibitor)	Posttranslational	Western blot, immunofluorescence	MHCC-97L SP cells	-	yes	(HU <i>et al.</i> , 2008)
rapamycin (mTOR inhibitor)	-	Western blot	human breast cancer cell lines MDA-MB-453 and MDA-MB-231	-	Yes	(ZHANG <i>et al.</i> , 2021)
NVP-BE235 (dual PIK3/mTOR inhibitor)	Posttranslational	Flow cytometry	SDM103T2 and ZL55 mesothelioma cells	-	Yes	(FISCHER <i>et al.</i> , 2012)
U0126 (MEK inhibitor)	Posttranslational	Western blot	MCF-7 and MCF-7/BCRP gastric cancer NCI-N87 cells	-	Yes	(IMAI <i>et al.</i> , 2009)
PD98059 (MEK inhibitor)	Posttranslational	Western blot, immunofluorescence	MCF-7/BCRP gastric cancer NCI-N87/BCRP cells	-	Yes	(IMAI <i>et al.</i> , 2009)
SP600125 (JNK inhibitor)	Transcriptional	RT-qPCR, Western blot	SW1116/HCP cells	-	-	(ZHU <i>et al.</i> , 2012)
PPAR γ agonists (telmisartan, rosiglitazone and pioglitazone)	Posttranscriptional	RT-qPCR, western blot, Immunofluorescence, Flow cytometry	MCF-7 FLV1000 and ABCG2-transfected HEK293 cells	-	Yes	(TO; TOMLINSON, 2013)
xanthines (caffeine and theophylline)	Posttranscriptional	Western blot, immunofluorescence	MCF-7/MX100, BeWo	-	Yes	(DING <i>et al.</i> , 2012)

One of the most well-known mechanisms of ABCG2 protein modulation involves the inhibition of EGFR stimulation or its downstream signaling pathways, including PI3K/AKT. Thus, the blockage of PI3K/AKT pathway with TKIs has been suggest to regulate ABCG2 expression, in addition to their use as inhibitors of ABCG2 (Table 2). Sorafenib, a multi-targeted TKI, decreased the ABCG2 expression in HEK293/ABCG2 cells. While the level of ABCG2 expression was reestablished when a lysosome inhibitor, bafilomycin A1 was used, a proteasome inhibitor, MG-132, did not lead to the reestablishment of expression levels (WEI *et al.*, 2012). Imatinib (a specific inhibitor for

BCR-ABL tyrosine kinase) reduced levels of ABCG2 in the plasma membrane and reduced total ABCG2 expression in BCR-ABL-expressing K562 cells, with no involvement of proteasome activation (NAKANISHI *et al.*, 2006). The reduction of the ABCG2 level in the membrane by imatinib was further confirmed [294]. Like imatinib, nilotinib and dasatinib reduced levels of ABCG2 in the membrane in K562 cells overexpressing ABCG2 (DOHSE *et al.*, 2010). Moreover, Yang *et al.* (YANG *et al.*, 2020) recently showed that gefitinib also decreased ABCG2 expression. Although the authors did not address the exact mechanism of ABCG2 regulation, gefitinib reduced the expression of both total and surface ABCG2 in MDCK/BCRP cells (PICK; WIESE, 2012). These findings suggest that TKIs have a dual mechanism of ABCG2 posttranslational regulation: translocation from the plasma membrane and protein degradation (PICK; WIESE, 2012).

Although PI3K/AKT has been suggested to control the level of transcription of ABCG2, it is mainly involved in the posttranslational regulation of ABCG2. This involvement was initially proposed based on the fact that AKT-1 null mice presented loss of the SP fraction in their bone marrow and the absence of active ABCG2 in the plasma membrane (MOGI *et al.*, 2003). Similar findings have also been reported for a variety of human cell lines, such as epithelial (AUST *et al.*, 2004b), hepatocarcinoma (HCC) (HU *et al.*, 2008) and glioma-derived stem-like cells (BLEAU *et al.*, 2009).

LY294002 and wortmannin are potent inhibitors of PI3K, thereby inhibiting the PI3K/AKT pathway as shown by the decreasing or abolishing of AKT phosphorylation (VLAHOS *et al.*, 1994; WALKER *et al.*, 2000). The effect of PI3K inhibitors on ABCG2 regulation is intriguing. Their use caused internalization of ABCG2 from the plasma membrane, without affecting the ABCG2 content in the total cell lysate, in porcine kidney LLCPK1 cells overexpressing ABCG2 (TAKADA *et al.*, 2005). In MDCK/BCRP cells, the internalization of ABCG2 also occurs, but with reduced total ABCG2 expression upon LY294002 treatment (PICK; WIESE, 2012). Likewise, wortmannin led to cytoplasmic accumulation of ABCG2 in human gallbladder epithelial cells (AUST *et al.*, 2004b). Similar results for LY294002 have been described in human glioma tumor stem-like cells and HCC cell line MHCC-97L, with no effect on ABCG2 expression (BLEAU *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2008). In contrast to wortmannin, LY294002 inhibited ABCG2 activity, without affecting either the ABCG2 protein content or the translocation of ABCG2 from the plasma membrane in breast cancer MCF-7 cells and epidermoid carcinoma A431 cells (IMAI *et al.*, 2012). Conversely, LY294002 decreased

the expression of total ABCG2 in human HNC SASL90d and OECM1 cell lines (YANG *et al.*, 2020) and in BCR-ABL-expressing K562 cells (NAKANISHI *et al.*, 2006). Thus, the effect of PI3K inhibition seems to depend on the cell line type.

Furthermore, inhibition of the AKT downstream effector mTOR also modulates ABCG2 expression and activity. Rapamycin, an inhibitor of mTOR complex 1 (mTORC1), induced translocation of ABCG2 from the plasma membrane, but did not modulate ABCG2 expression in HCC cell line MHCC-97L (HU *et al.*, 2008). However, the same compound was recently described as an inhibitor of ABCG2 expression, as assessed by western blot in human breast cancer cell lines MDA-MB-453 and MDA-MB-231 (ZHANG *et al.*, 2021). NVP-BEZ235 is an imidazo[4,5-c]quinoline derivative that inhibits the kinase activity of mTOR and PI3K (MAIRA *et al.*, 2008). This compound reduced the presence of ABCG2 in the plasma membrane in SDM103T2 and ZL55 mesothelioma cells (FISCHER *et al.*, 2012).

Xanthines, such as caffeine and theophylline, reduced the expression of total ABCG2 through activation of the lysosomal degradation pathway and also induced ABCG2 internalization in MCF-7/MX100 and BeWo cells (DING *et al.*, 2012), with the involvement of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (DING *et al.*, 2013).

PPAR γ agonists such as the angiotensin II receptor blocker telmisartan and thiazolidinediones (rosiglitazone and pioglitazone), have been used to modulate ABCG2. These compounds activate the effector phosphatase and tensin homologue (PTEN), a negative regulator of the PI3K/AKT pathway, reducing both expression of ABCG2 in the cell membrane and the transport activity of ABCG2, without decreasing ABCG2 mRNA or ABCG2 protein expression in MCF-7 FLV1000 cells (TO; TOMLINSON, 2013).

In addition to regulation of the ABCG2 gene expression, estrogens also modulate ABCG2 protein expression. 17 β -estradiol treatment reduced both ABCG2 activity and ABCG2 expression in human breast cancer cell lines MCF-7, MCF7 overexpressing ABCG2, T-47D and MDA-MB-231 (IMAI *et al.*, 2005). However, it mediated signaling via ER α and not ER β , as reported for BeWo cells (WANG *et al.*, 2006b). In contrast, Imai *et al.* (IMAI *et al.*, 2005) showed that 17 β -estradiol did not affect ABCG2 expression in ovarian cancer SKOV-3 cells and lung cancer A549 cells. These findings suggest that the effect of 17 β -estradiol on both ABCG2 mRNA and protein regulation is cell-type specific. Furthermore, 17 β -estradiol activated PTEN, leading to decreased expression of ABCG2 by activation of the proteasomal

degradation pathway in rat brain capillaries (HARTZ *et al.*, 2010). Although the use of inhibitors in non-human cell lines is beyond of the scope of this review, this work is described in Table 3 due to the confirmation of 17 β -estradiol as a negative modulator of ABCG2 using *in vivo* models.

MEK inhibitors, such as PD98059 and U0126, showed a dual effect on ABCG2 regulation. These compounds up-regulated endogenous ABCG2 gene expression, while U0126 increased endogenous ABCG2 protein degradation in breast cancer MCF-7 cells. In MCF-7 and gastric cancer NCI-N87 cells overexpressing ABCG2, PD98059 and U0126 led to decreased ABCG2 expression due to increased protein degradation, which could be reversed by the lysosome inhibitor, bafilomycin A1, in the absence of transcriptional regulation (IMAI *et al.*, 2009).

Fasudil reduced not only expression of ABCG2 through inhibition of the ROCK2 signaling pathway, but also translocation of ABCG2 to the plasma membrane in glioma cell lines, reverting their resistance to temozolomide (ZHANG *et al.*, 2018a). These findings corroborate previous studies that showed that ROCK signaling induced expression of P-gp in mice intestinal mucosa (KOBORI *et al.*, 2013) and decreased the presence of P-gp in the plasma membrane in knockdown of radixin, a downstream effector of ROCK in the HepG2 cell line (KANO *et al.*, 2011).

PZ-series named as PZ-39 (PENG *et al.*, 2009), PZ-8, PZ-34 and PZ-38 (PENG *et al.*, 2010) also reduced ABCG2 expression through lysosome-mediated ABCG2 degradation, whereas they did not affect ABCG2 mRNA level in the HEK293/ABCG2 cell line.

Taken together, compounds reduce functional ABCG2 by increasing degradation or accelerating translocation of ABCG2 from the plasma membrane. In most of the examples described here, the modulators of protein expression also inhibit transporter activity (Table 3). In some cases, only the total ABCG2 content was determined by western blot, with no further investigation. However, sorafenib, caffeine, MEK inhibitors (PD98059 and U0126) and PZ-series targeted the lysosome pathway for ABCG2 degradation (DING *et al.*, 2012; IMAI *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2009, 2010; WEI *et al.*, 2012). Considering this evidence, we suggest that lysosome-targeting chimeras (LYTAC) could be explored for down-regulation of ABCG2 protein expression (BANIK *et al.*, 2020).

The reduced expression of ABCG2 in the plasma membrane using 5D3 antibody recognition by flow cytometric detection should be carefully analyzed. As previously

discussed, inhibitors that affect ABCG2 function can trigger conformational changes, increasing the exposure of extracellular epitopes, which consequently increases immunoreactivity. This finding is exemplified by the known functional inhibitor Ko143, which does not affect ABCG2 expression at the cell membrane, but enhances interaction with the 5D3 antibody (PICK; WIESE, 2012). In order to prevent misinterpretation, it is necessary to confirm the internalization of ABCG2 using another technique. The combined analysis of 5D3 binding and immunolabelling is widely used.

8. Conclusions

Over the past two decades, there has been a tremendous effort in the development of new ABCG2 inhibitors to be used in association with chemotherapeutic agents. However, significant challenges remain, such as toxicity and selectivity. In this review, the minimal characteristics of robust ABCG2 inhibitors and methods for identification and characterization of the biochemical and molecular mechanisms of inhibition were presented. In addition, it was proposed that ABC transporter inhibitors are promising to circumvent MDR in CSC. Alternatively, the use of compounds as modulators of ABCG2 expression was presented as an emerging strategy to overcome MDR mediated by ABCG2. In addition, it was suggested that some compounds act as functional inhibitors and down-regulate the expression of ABCG2 at both transcriptional and posttranslational level. This dual effect might improve the treatment of cancer targeting ABCG2.

References

- K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek, Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.
- Y.A. Luqmani, Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy, *Med. Princ. Pract.* 14(suppl 1 (2005) 35–48. <https://doi.org/10.1159/000086183>.
- Q. Wu, Z. Yang, Y. Nie, Y. Shi, D. Fan, Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches, *Cancer Lett.* 347 (2014) 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>.
- S.M. Simon, M. Schindler, Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 3497 LP – 3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3497>.
- M. Dean, The genetics of ATP-binding cassette transporters., *Methods Enzymol.* 400 (2005) 409–429. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00024-8).
- M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets, The human ATP-binding cassette (ABC)

- transporter superfamily, *Genome Res.* 11 (2001) 1156–1166.
<https://doi.org/10.1101/gr.184901>.
- M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of multidrug mediated resistance by the Multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385–427.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002125>.
- R.W. Robey, S. Shukla, E.M. Finley, R.K. Oldham, D. Barnett, S. V Ambudkar, T. Fojo, S.E. Bates, Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1., *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 1302–1312.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.001>.
- I.S. Mohammad, W. He, L. Yin, Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR., *Biomed. Pharmacother.* 100 (2018) 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.038>.
- K.J. Linton, Structure and Function of ABC Transporters, *Physiology.* 22 (2007) 122–130. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>.
- I.B. Holland, ABC transporters, mechanisms and biology: an overview, *Essays Biochem.* 50 (2011) 1–17. <https://doi.org/10.1042/bse0500001>.
- Y. Choi, A. Yu, ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 793–807.
<https://doi.org/10.2174/138161282005140214165212>.
- R.L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 455 (1976) 152–162. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).
- S.P.C. Cole, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. V Duncan, R.G. Deeley, Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line, *Science* (80-.). 258 (1992) 1650–1654. <https://doi.org/10.1126/science.1360704>.
- K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer, D.D. Ross, Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 1084–1103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.002>.
- L.A. Doyle, W. Yang, L. V Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, D.D. Ross, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 15665–15670.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>.
- K. Miyake, L. Mickley, T. Litman, Z. Zhan, R. Robey, B. Cristensen, M. Brangi, L. Greenberger, M. Dean, T. Fojo, S.E. Bates, Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes., *Cancer Res.* 59 (1999) 8–13.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/1/8.abstract>.
- R. Allikmets, L.M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica, M. Dean, A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance., *Cancer Res.* 58 (1998) 5337–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850061>.
- O. Polgar, R.W. Robey, S.E. Bates, ABCG2: structure, function and role in drug response, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 1–15.
<https://doi.org/10.1517/17425255.4.1.1>.
- M.L.H. Vlaming, J.S. Lagas, A.H. Schinkel, Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in ABCG2 knockout mice, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.007>.
- A.E. van Herwaarden, A.H. Schinkel, The function of breast cancer resistance protein

- in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.007>.
- I. Ifergan, A. Shafran, G. Jansen, J.H. Hooijberg, G.L. Scheffer, Y.G. Assaraf, Folate Deprivation Results in the Loss of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2) Expression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25527–25534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401725200>.
- S. Zhou, Y. Zong, P.A. Ney, G. Nair, C.F. Stewart, B.P. Sorrentino, Increased expression of the ABCG2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels., *Blood*. 105 (2005) 2571–2576. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1566>.
- L.J.A. Hardwick, S. Velamakanni, H.W. van Veen, The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2), *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 163–174. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707218>.
- C.N. Cavasotto, S.S. Phatak, Homology modeling in drug discovery: current trends and applications, *Drug Discov. Today*. 14 (2009) 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.04.006>.
- E. Hazai, Z. Bikádi, Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2), *J. Struct. Biol.* 162 (2008) 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.12.001>.
- Y.-F. Li, O. Polgar, M. Okada, L. Esser, S.E. Bates, D. Xia, Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: A molecular modeling study, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2007) 837–851. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.08.005>.
- J.-Y. Lee, L.N. Kinch, D.M. Borek, J. Wang, J. Wang, I.L. Urbatsch, X.-S. Xie, N. V Grishin, J.C. Cohen, Z. Otwinowski, H.H. Hobbs, D.M. Rosenbaum, Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8, *Nature*. 533 (2016) 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature17666>.
- L. László, B. Sarkadi, T. Hegedűs, Jump into a New Fold—A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter, *PLoS One*. 11 (2016) e0164426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164426>.
- H. Kawahara, K. Noguchi, K. Katayama, J. Mitsushashi, Y. Sugimoto, Pharmacological interaction with sunitinib is abolished by a germ-line mutation (1291T>C) of BCRP/ABCG2 gene, *Cancer Sci.* 101 (2010) 1493–1500. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01539.x>.
- T. Gose, T. Shafi, Y. Fukuda, S. Das, Y. Wang, A. Allcock, A. Gavan McHarg, J. Lynch, T. Chen, I. Tamai, A. Shelat, R.C. Ford, J.D. Schuetz, ABCG2 requires a single aromatic amino acid to “clamp” substrates and inhibitors into the binding pocket, *FASEB J.* 34 (2020) 4890–4903. <https://doi.org/10.1096/fj.201902338RR>.
- N.M.I. Taylor, I. Manolaridis, S.M. Jackson, J. Kowal, H. Stahlberg, K.P. Locher, Structure of the human multidrug transporter ABCG2., *Nature*. 546 (2017) 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>.
- S.M. Jackson, I. Manolaridis, J. Kowal, M. Zechner, N.M.I. Taylor, M. Bause, S. Bauer, R. Bartholomaeus, G. Bernhardt, B. Koenig, A. Buschauer, H. Stahlberg, K.-H. Altmann, K.P. Locher, Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2018) 333–340. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0049-1>.
- I. Manolaridis, S.M. Jackson, N.M.I. Taylor, J. Kowal, H. Stahlberg, K.P. Locher, Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states, *Nature*. 563 (2018) 426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0680-3>.

- N. Khunweeraphong, D. Szöllősi, T. Stockner, K. Kuchler, The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid, *Nat. Commun.* 10 (2019) 5433. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13302-2>.
- B.J. Orlando, M. Liao, ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16155-2>.
- J. Kowal, D. Ni, S.M. Jackson, I. Manolaridis, H. Stahlberg, K.P. Locher, Structural Basis of Drug Recognition by the Multidrug Transporter ABCG2, *J. Mol. Biol.* 433 (2021) 166980. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166980>.
- T.J. Altstadt, C.R. Fairchild, J. Golik, K.A. Johnston, J.F. Kadow, F.Y. Lee, B.H. Long, W.C. Rose, D.M. Vyas, H. Wong, M.-J. Wu, M.D. Wittman, Synthesis and Antitumor Activity of Novel C-7 Paclitaxel Ethers: Discovery of BMS-184476, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4577–4583. <https://doi.org/10.1021/jm0102607>.
- M. Distefano, G. Scambia, C. Ferlini, C. Gaggini, R. De Vincenzo, A. Riva, E. Bombardelli, I. Ojima, A. Fattorossi, P.B. Panici, S. Mancuso, Anti-proliferative activity of a new class of taxanes (14 β -hydroxy-10-deacetylbaccatin III derivatives) on multidrug-resistance-positive human cancer cells, *Int. J. Cancer.* 72 (1997) 844–850. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970904\)72:5<844::AID-IJC22>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970904)72:5<844::AID-IJC22>3.0.CO;2-7).
- M. Shionoya, T. Jimbo, M. Kitagawa, T. Soga, A. Tohgo, DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo, *Cancer Sci.* 94 (2003) 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01465.x>.
- H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes, B. Sarkadi, The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, *Metabolism and Toxicity, Curr. Drug Deliv.* 1 (2004) 27–42. <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>.
- G. Szakács, M.D. Hall, M.M. Gottesman, A. Boumendjel, R. Kachadourian, B.J. Day, H. Baubichon-Cortay, A. Di Pietro, Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5753–5774. <https://doi.org/10.1021/cr4006236>.
- W. Szybaski, V. Bryson, Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics, *J. Bacteriol.* 64 (1952) 489–499. <https://doi.org/10.1128/jb.64.4.489-499.1952>.
- N.T. Bech-Hansen, J.E. Till, V. Ling, Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity., *J. Cell. Physiol.* 88 (1976) 23–31. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040880104>.
- J.R. Warr, D.J. Flanagan, M. Anderson, Mutants of Chinese hamster ovary cells with altered sensitivity to taxol and benzimidazole carbamates, *Cell Biol. Int. Rep.* 6 (1982) 455–460. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(82\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0309-1651(82)90117-5).
- J.R. Warr, F. Brewer, M. Anderson, J. Fergusson, Verapamil hypersensitivity of vincristine resistant Chinese hamster ovary cell lines., *Cell Biol. Int. Rep.* 10 (1986) 389–399. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(86\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0309-1651(86)90011-1).
- J.R. Warr, M. Anderson, J. Fergusson, Properties of verapamil-hypersensitive multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells., *Cancer Res.* 48 (1988) 4477–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2899455>.
- D.F. Cano-Gauci, J.R. Riordan, Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells. Specific cytotoxicity independent of increased cancer drug accumulation., *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 2115–2123. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90139-0).
- J. Karwatsky, M.C. Lincoln, E. Georges, A Mechanism for P-Glycoprotein-Mediated Apoptosis As Revealed by Verapamil Hypersensitivity, *Biochemistry.* 42 (2003) 12163–12173. <https://doi.org/10.1021/bi034149+>.

- D. Trompier, X.-B. Chang, R. Barattin, A. du M. D'Hardemare, A. Di Pietro, H. Baubichon-Cortay, Verapamil and Its Derivative Trigger Apoptosis through Glutathione Extrusion by Multidrug Resistance Protein MRP1, *Cancer Res.* 64 (2004) 4950–4956. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0143>.
- D.W. Loe, R.G. Deeley, S.P. Cole, Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1)., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 530–8. <https://jpet.aspetjournals.org/content/293/2/530>.
- V. Kuete, P.D. Tchakam, B. Wiench, B. Ngameni, H.K. Wabo, M.F. Tala, M.L. Mounsang, B.T. Ngadjui, T. Murayama, T. Efferth, Cytotoxicity and modes of action of four naturally occurring benzophenones: 2,2',5,6'-Tetrahydroxybenzophenone, guttiferone E, isogarcinol and isoxanthochymol, *Phytomedicine.* 20 (2013) 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.003>.
- S.K. Rabindran, H. He, M. Singh, E. Brown, K.I. Collins, T. Annable, L.M. Greenberger, Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C., *Cancer Res.* 58 (1998) 5850–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865745>.
- J.D. Allen, A. van Loevezijn, J.M. Lakhai, M. van der Valk, O. van Tellingen, G. Reid, J.H.M. Schellens, G.-J. Koomen, A.H. Schinkel, Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C., *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 417–25. <http://mct.aacrjournals.org/content/1/6/417.abstract>.
- M. de Bruin, K. Miyake, T. Litman, R. Robey, S.E. Bates, Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR, *Cancer Lett.* 146 (1999) 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00182-2).
- L.D. Weidner, S.S. Zoghbi, S. Lu, S. Shukla, S. V. Ambudkar, V.W. Pike, J. Mulder, M.M. Gottesman, R.B. Innis, M.D. Hall, The inhibitor Ko143 is not specific for ABCG2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354 (2015) 384–393. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225482>.
- Y.A. Gandhi, M.E. Morris, Structure–Activity Relationships and Quantitative Structure–Activity Relationships for Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2), *AAPS J.* 11 (2009) 541. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9132-1>.
- J.S. Shim, J.O. Liu, Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs, *Int J Biol Sci.* 10 (2014) 654–663. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9224>.
- Y. Zhang, A. Gupta, H. Wang, L. Zhou, R.R. Vethanayagam, J.D. Unadkat, Q. Mao, BCRP Transports Dipyrindamole and is Inhibited by Calcium Channel Blockers, *Pharm. Res.* 22 (2005) 2023–2034. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-8384-4>.
- Y. Toyoda, T. Takada, H. Suzuki, Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 208. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00208>.
- J. Weiss, W.E. Haefeli, Potential of the novel antiretroviral drug rilpivirine to modulate the expression and function of drug transporters and drug-metabolising enzymes in vitro., *Int. J. Antimicrob. Agents.* 41 (2013) 484–487. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.01.004>.
- A. Gupta, Y. Zhang, J.D. Unadkat, Q. Mao, HIV Protease Inhibitors Are Inhibitors but Not Substrates of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (2004) 334–341. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065342>.
- H. Miyata, T. Takada, Y. Toyoda, H. Matsuo, K. Ichida, H. Suzuki, Identification of Febuxostat as a New Strong ABCG2 Inhibitor: Potential Applications and Risks in Clinical Situations, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 518.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00518>.

N. Guragossian, B. Belhani, A. Moreno, M.T. Nunes, L. Gonzalez-Lobato, C. Marminon, L. Berthier, A. Do Rocio Andrade Pires, C. Özvegy-Laczka, B. Sarkadi, R. Terreux, Z. Bouaziz, M. Berredjem, J. Jose, A. Di Pietro, P. Falson, M. Le Borgne, Uncompetitive nanomolar dimeric indenoindole inhibitors of the human breast cancer resistance pump ABCG2, *Eur. J. Med. Chem.* 211 (2021) 113017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113017>.

A. Boumendjel, S. Macalou, A. Ahmed-Belkacem, M. Blanc, A. Di Pietro, Acridone derivatives: Design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 2892–2897.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.02.017>.

R. Yamazaki, Y. Nishiyama, T. Furuta, H. Hatano, Y. Igarashi, N. Asakawa, H. Kodaira, H. Takahashi, R. Aiyama, T. Matsuzaki, N. Yagi, Y. Sugimoto, Novel acrylonitrile derivatives, YHO-13177 and YHO-13351, reverse BCRP/ABCG2-mediated drug resistance in vitro and in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 1252–1263. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0874>.

A. Spindler, K. Stefan, M. Wiese, Synthesis and Investigation of Tetrahydro- β -carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2), *J. Med. Chem.* 59 (2016) 6121–6135.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00035>.

J. Weiss, J. Kocher, C. Mueller, S. Rosenzweig, D. Theile, Impact of enzalutamide and its main metabolite N-desmethyl enzalutamide on pharmacokinetically important drug metabolizing enzymes and drug transporters, *Biopharm. Drug Dispos.* 38 (2017) 517–525. <https://doi.org/10.1002/bdd.2103>.

J. Weiss, A. Sayer, N. Divac, M. Herzog, E. Schwedhelm, R.H. Böger, W.E. Haefeli, R.A. Benndorf, Interaction of Angiotensin Receptor Type 1 Blockers with ATP-binding Cassette Transporters, *Biopharm. Drug Dispos.* 31 (2010) 150–161.

<https://doi.org/10.1002/bdd.699>.

P. Matsson, J.M. Pedersen, U. Norinder, C.A.S. Bergström, P. Artursson, Identification of Novel Specific and General Inhibitors of the Three Major Human ATP-Binding Cassette Transporters P-gp, BCRP and MRP2 Among Registered Drugs, *Science* (80-.). 26 (2009) 1816–1831. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9896-0>.

A. Gupta, J.J. Harris, J. Lin, J.P. Bulgarelli, B.K. Birmingham, S.W. Grimm, Fusidic acid inhibits hepatic transporters and metabolic enzymes: Potential cause of clinical drug-drug interaction observed with statin coadministration, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 5986–5994. <https://doi.org/10.1128/AAC.01335-16>.

K. Shiozawa, M. Oka, H. Soda, M. Yoshikawa, Y. Ikegami, J. Tsurutani, K. Nakatomi, Y. Nakamura, S. Doi, T. Kitazaki, Y. Mizuta, K. Murase, H. Yoshida, D.D. Ross, S. Kohno, Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic, *Int. J. Cancer.* 108 (2003) 146–151. <https://doi.org/10.1002/ijc.11528>.

R. Elsbey, V. Smith, L. Fox, D. Stresser, C. Butters, P. Sharma, D.D. Surry, Validation of membrane vesicle-based breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 2 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions, *Xenobiotica.* 41 (2011) 764–783.

<https://doi.org/10.3109/00498254.2011.578761>.

C. Gedeon, J. Behravan, G. Koren, M. Piquette-Miller, Transport of Glyburide by Placental ABC Transporters: Implications in Fetal Drug Exposure, *Placenta.* 27 (2006) 1096–1102. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.11.012>.

- V.J.C. Lempers, J.J.M.W. van den Heuvel, F.G.M. Russel, R.E. Aarnoutse, D.M. Burger, R.J. Brüggemann, J.B. Koenderink, Inhibitory Potential of Antifungal Drugs on ATP-Binding Cassette Transporters P-Glycoprotein, MRP1 to MRP5, BCRP, and BSEP., *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 3372–3379. <https://doi.org/10.1128/AAC.02931-15>.
- A. Gupta, J.D. Unadkat, Q. Mao, Interactions of Azole Antifungal Agents with the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), *Drug Discov. Interface.* 96 (2007) 3226–3235. <https://doi.org/10.1002/jps.20963>.
- X. Chu, X. Cai, D. Cui, C. Tang, A. Ghosal, G. Chan, M.D. Green, Y. Kuo, Y. Liang, C.M. Maclolek, J. Palamanda, R. Evers, T. Prueksaritanont, In vitro assessment of drug-drug interaction potential of boceprevir associated with drug metabolizing enzymes and transporters, *Drug Metab. Dispos.* 41 (2013) 668–681. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.049668>.
- Y. Fujita, K. Noguchi, T. Suzuki, K. Katayama, Y. Sugimoto, Biochemical interaction of anti-HCV telaprevir with the ABC transporters P-glycoprotein and breast cancer resistance protein, *BMC Res. Notes.* 6 (2013) 445. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-445>.
- J. Weiss, J. Rose, C.H. Storch, N. Ketabi-Kiyanvash, A. Sauer, W.E. Haefeli, T. Efferth, Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs, *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2007) 238–245. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl474>.
- S.R. Rijpma, J.J.M.W. Van Den Heuvel, M. Van Der Velden, R.W. Sauerwein, F.G.M. Russel, J.B. Koenderink, Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity, *Malar. J.* 13 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-359>.
- K. Suzuki, K. Doki, M. Homma, H. Tamaki, S. Hori, H. Ohtani, Y. Sawada, Y. Kohda, Co-administration of proton pump inhibitors delays elimination of plasma methotrexate in high-dose methotrexate therapy, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 67 (2009) 44–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03303.x>.
- L.H.M. Te Brake, F.G.M. Russel, J.J.M.W. Van Den Heuvel, G.J. De Knecht, J.E. De Steenwinkel, D.M. Burger, R.E. Aarnoutse, J.B. Koenderink, Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters, *Tuberculosis.* 96 (2016) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.08.004>.
- S. Shukla, R.W. Robey, S.E. Bates, S. V Ambudkar, The Calcium Channel Blockers, 1,4-Dihydropyridines, Are Substrates of the Multidrug Resistance-Linked ABC Drug Transporter, ABCG2, *Biochemistry.* 45 (2006) 8940–8951. <https://doi.org/10.1021/bi060552f>.
- X.F. Zhou, X. Yang, Q. Wang, R.A. Coburn, M.E. Morris, Effects of dihydropyridines and pyridines on multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein: In vitro and in vivo studies, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 1220–1228. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003558>.
- M.L. Holland, D.T.T. Lau, J.D. Allen, J.C. Arnold, The multidrug transporter ABCG2 (BCRP) is inhibited by plant-derived cannabinoids., *Br. J. Pharmacol.* 152 (2007) 815–824. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707467>.
- G. Valdameri, C. Gauthier, R. Terreux, R. Kachadourian, B.J. Day, S.M.B. Winnischofer, M.E.M. Rocha, V. Frachet, X. Ronot, A. Di Pietro, A. Boumendjel, Investigation of Chalcones as Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein: Critical Role of Methoxylation in both Inhibition Potency and Cytotoxicity, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 3193–3200. <https://doi.org/10.1021/jm2016528>.
- Y. Han, M. Riwanto, M.-L. Go, P.L.R. Ee, Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues, *Eur. J. Pharm. Sci.* 35

- (2008) 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.06.001>.
- E. Winter, G.J. Gozzi, L.D. Chiaradia-Delatorre, N. Daflon-Yunes, R. Terreux, C. Gauthier, A. Mascarello, P.C. Leal, S.M. Cadena, R.A. Yunes, R.J. Nunes, T.B. Creczynski-Pasa, A. Di Pietro, Quinoxaline-substituted chalcones as new inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2: polyspecificity at B-ring position., *Drug Des. Devel. Ther.* 8 (2014) 609–619. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S56625>.
- A. do R.A. Pires, F. Lecerf-Schmidt, N. Guragossian, J. Pazinato, G.J. Gozzi, E. Winter, G. Valdameri, A. Veale, A. Boumendjel, A. Di Pietro, B. Pérès, New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2., *Eur. J. Med. Chem.* 122 (2016) 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.053>.
- W. Chearwae, S. Shukla, P. Limtrakul, S. V Ambudkar, Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1995–2006. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0087>.
- E.I. Lepist, T.K. Phan, A. Roy, L. Tong, K. MacLennan, B. Murray, A.S. Ray, Cobicistat boosts the intestinal absorption of transport substrates, including HIV protease inhibitors and GS-7340, in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012) 5409–5413. <https://doi.org/10.1128/AAC.01089-12>.
- S. Zhang, X. Yang, M.E. Morris, Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 1208–1216. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1208>.
- H.C. Cooray, T. Janvilisri, H.W. van Veen, S.B. Hladky, M.A. Barrand, Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2004) 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.040>.
- A. Ahmed-Belkacem, A. Pozza, F. Muñoz-Martínez, S.E. Bates, S. Castanys, F. Gamarro, A. Di Pietro, J.M. Pérez-Victoria, Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2., *Cancer Res.* 65 (2005) 4852–4860. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1817>.
- X. Zhu, I.L.K. Wong, K.-F. Chan, J. Cui, M.C. Law, T.C. Chong, X. Hu, L.M.C. Chow, T.H. Chan, Triazole Bridged Flavonoid Dimers as Potent, Nontoxic, and Highly Selective Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Inhibitors., *J. Med. Chem.* 62 (2019) 8578–8608. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00963>.
- P. Pavék, G. Merino, E. Wagenaar, E. Bolscher, M. Novotna, J.W. Jonker, A.H. Schinkel, Human cancer resistance protein: Interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (2005) 144–152. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.073916>.
- Y. Zhang, J. Laterra, M.G. Pomper, Hedgehog pathway inhibitor HhAntag691 is a potent inhibitor of ABCG2/BCRP and ABCB1/Pgp, *Neoplasia*. 11 (2009) 96–101. <https://doi.org/10.1593/neo.81264>.
- A. Gupta, Y. Dai, R.R. Vethanayagam, M.F. Hebert, K.E. Thummel, J.D. Unadkat, D.D. Ross, Q. Mao, Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58 (2006) 374–383. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0173-6>.
- C.J. Henrich, H.R. Bokesch, M. Dean, S.E. Bates, R.W. Robey, E.I. Goncharova, J.A. Wilson, J.B. McMahon, A high-throughput cell-based assay for inhibitors of ABCG2 activity., *J. Biomol. Screen.* 11 (2006) 176–183.

<https://doi.org/10.1177/1087057105284576>.

N. Tournier, L. Chevillard, B. Megarbane, S. Pirnay, J.M. Scherrmann, X. Decleves, Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2), *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13 (2010) 905–915.

<https://doi.org/10.1017/s1461145709990848>.

M. Kühnle, M. Egger, C. Müller, A. Mahringer, G. Bernhardt, G. Fricker, B. König, A. Buschauer, Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the P-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1190–1197. <https://doi.org/10.1021/jm8013822>.

I.F. Zattoni, T. Kronenberger, D.H. Kita, L.D. Guanaes, M.M. Guimarães, L. de Oliveira Prado, M. Ziasch, L.C. Vesga, F. Gomes de Moraes Rego, G. Picheth, M.B. Gonçalves, M.D. Nosedá, D.R.B. Ducatti, A. Poso, R.W. Robey, S. V Ambudkar, V.R. Moure, A.G. Gonçalves, G. Valdameri, A new porphyrin as selective substrate-based inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Chem. Biol. Interact.* 351 (2022) 109718. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109718>.

G. Gozzi, Z. Bouaziz, E. Winter, N. Daflon-Yunes, D. Aichele, A. Nacereddine, C. Marminon, G. Valdameri, W. Zeinyeh, A. Bollacke, J. Guillon, A. Lacoudre, N. Pinaud, S.M. Cadena, J. Jose, M. Le Borgne, A. Di Pietro, Converting Potent Indeno[1,2-b]indole Inhibitors of Protein Kinase CK2 into Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein ABCG2, *J Med Chem.* 58 (2014) 265–277. <https://doi.org/10.1021/jm500943z>.

D.H. Kita, N. Guragossian, I.F. Zattoni, V.R. Moure, F.G. de M. Rego, S. Lusvarghi, T. Moulenat, B. Belhani, G. Picheth, S. Bouacida, Z. Bouaziz, C. Marminon, M. Berredjem, J. Jose, M.B. Gonçalves, S. V Ambudkar, G. Valdameri, M. Le Borgne, Mechanistic basis of breast cancer resistance protein inhibition by new indeno[1,2-b]indoles, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1788. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79892-w>.
C. Guo, F. Liu, J. Qi, J. Ma, S. Lin, C. Zhang, Q. Zhang, H. Zhang, R. Lu, X. Li, A Novel Synthetic Dihydroindeno[1,2-b] Indole Derivative (LS-2-3j) Reverses ABCB1- and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells., *Molecules.* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23123264>.

G. Valdameri, L. Pereira Rangel, C. Spatafora, J. Guitton, C. Gauthier, O. Arnaud, A. Ferreira-Pereira, P. Falson, S.M.B. Winnischofer, M.E.M. Rocha, C. Tringali, A. Di Pietro, Methoxy Stilbenes as Potent, Specific, Untransported, and Noncytotoxic Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 322–330. <https://doi.org/10.1021/cb200435y>.

F. Antoni, M. Bause, M. Scholler, S. Bauer, S.A. Stark, S.M. Jackson, I. Manolaridis, K.P. Locher, B. König, A. Buschauer, G. Bernhardt, Tariquidar-related triazoles as potent, selective and stable inhibitors of ABCG2 (BCRP), *Eur. J. Med. Chem.* 191 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112133>.

A. Poirier, R. Portmann, A.C. Cascais, U. Bader, I. Walter, M. Ullah, C. Funk, The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: Why, when, and how?, *Drug Metab. Dispos.* 42 (2014) 1466–1477. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.058248>.

K. Yang, Y. Chen, K.K. Wah To, F. Wang, D. Li, L. Chen, L. Fu, Alectinib (CH5424802) antagonizes ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug resistance in vitro, in vivo and ex vivo, *Exp. Mol. Med.* 49 (2017) e303-13. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.168>.

C.-P. Wua, S. Lusvarghi, J.-C. Wanga, S.-H. Hsiao, Y.-H. Huang, T.-H. Hung, S. V. Ambudkar, Avapritinib: A Selective Inhibitor of KIT and PDGFR α that Reverses

- ABCB1 and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cell Lines, *Mol. Pharm.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00274>. Avapritinib.
- C. Hegedus, C. Ozveg-Laczka, A. Apáti, M. Magócsi, K. Némét, L. Orfi, G. Kéri, M. Katona, Z. Takáts, A. Váradi, G. Szakács, B. Sarkadi, Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties., *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 1153–1164. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00383.x>.
- J. Weiss, D. Theile, Z. Dvorak, W. Haefeli, Interaction Potential of the Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Dovitinib with Drug Transporters and Drug Metabolising Enzymes Assessed in Vitro, *Pharmaceutics*. 6 (2014) 632–650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6040632>.
- K. Noguchi, H. Kawahara, A. Kaji, K. Katayama, J. Mitsuhashi, Y. Sugimoto, Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1701–1707. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01213.x>.
- R. Elsby, P. Martin, D. Surry, P. Sharma, K. Fenner, Solitary Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Efflux Transporter Results in a Clinically Significant Drug-Drug Interaction with Rosuvastatin by Causing up to a 2-Fold Increase in Statin Exposure, *Drug Metab. Dispos.* 44 (2016) 398–408. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.066795>.
- Y. Nakamura, M. Oka, H. Soda, K. Shiozawa, M. Yoshikawa, A. Itoh, Y. Ikegami, J. Tsurutani, K. Nakatomi, T. Kitazaki, S. Doi, H. Yoshida, S. Kohno, Gefitinib (Iressa, ZD1839), an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Reverses Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2 Mediated Drug Resistance, *Cancer Res.* 65 (2005) 1541–1546. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2417>.
- C.L. Dai, A.K. Tiwari, C.P. Wu, X.D. Su, S.R. Wang, D.G. Liu, C.R. Ashby, Y. Huang, R.W. Robey, Y.J. Liang, L.M. Chen, C.J. Shi, S. V. Ambudkar, Z.S. Chen, L.W. Fu, Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2, *Cancer Res.* 68 (2008) 7905–7914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0499>.
- A.K. Tiwari, K. Sodani, S.-R.R. Wang, Y.-H.H. Kuang, C.R.J. Ashby, X. Chen, Z.-S.S. Chen, Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters., *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.002>.
- R. Sen, K. Natarajan, J. Bhullar, S. Shukla, H.-B. Fang, L. Cai, Z.-S. Chen, S. V Ambudkar, M.R. Baer, The Novel BCR-ABL and FLT3 Inhibitor Ponatinib Is a Potent Inhibitor of the MDR-Associated ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2, *Mol. Cancer Ther.* 11 (2012) 2033–2044. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0302>.
- Y. Zhang, Y. Wang, Z. Lei, G. Zhang, X. Zhang, D. Wang, S.B. Al-rihani, S. Shukla, S. V Ambudkar, A. Kaddoumi, Z. Shi, Z. Chen, Regorafenib antagonizes BCRP-mediated multidrug resistance in colon cancer, *Cancer Lett.* 442 (2019) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.032>.
- S. Hu, Z. Chen, R. Franke, S. Orwick, M. Zhao, M.A. Rudek, A. Sparreboom, S.D. Baker, Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 6062–6069. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0048>.
- L.S. Zheng, F. Wang, Y.H. Li, X. Zhang, L.M. Chen, Y.J. Liang, C.L. Dai, Y.Y. Yan, L.Y. Tao, Y.J. Mi, A.K. Yang, K.K. Wah To, L.W. Fu, Vandetanib (Zactima, ZD6474)

- antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function, *PLoS One*. 4 (2009) 7–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005172>.
- D. Yang, R.J. Kathawala, E.E. Chufan, A. Patel, S. V. Ambudkar, Z.S. Chen, X. Chen, Tivozanib reverses multidrug resistance mediated by ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2 (BCRP), *Futur. Oncol.* 10 (2014) 1827–1841.
<https://doi.org/10.2217/FON.13.253>.
- P.J. Houghton, G.S. Germain, F.C. Harwood, J.D. Schuetz, C.F. Stewart, E. Buchdunger, P. Traxler, Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro, *Cancer Res.* 64 (2004) 2333–2337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3344>.
- R. Ding, J. Shi, K. Pabon, K.W. Scotto, Xanthines down-regulate the drug transporter ABCG2 and reverse multidrug resistance, *Mol. Pharmacol.* 81 (2012) 328–337.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.075556>.
- H.-M. Sim, C.-Y. Lee, P.L.R. Ee, M.-L. Go, Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein), *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 35 (2008) 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.07.008>.
- J. Yuan, I.L.K. Wong, T. Jiang, S.W. Wang, T. Liu, B.J. Wen, L.M.C. Chow, B. Wan Sheng, Synthesis of methylated quercetin derivatives and their reversal activities on P-gp- and BCRP-mediated multidrug resistance tumour cells., *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.05.026>.
- P. Limtrakul, W. Chearwae, S. Shukla, C. Phisalpong, S. V Ambudkar, Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin., *Mol. Cell. Biochem.* 296 (2007) 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9302-8>.
- D. Theile, P. Wizgall, Acquired ABC-transporter overexpression in cancer cells: transcriptional induction or Darwinian selection?, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 394 (2021) 1621–1632. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02112-3>.
- R.W. Robey, K.M. Pluchino, M.D. Hall, A.T. Fojo, S.E. Bates, M.M. Gottesman, Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 18 (2018) 452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.
- V.S. Donnerberg, A.D. Donnerberg, Multiple Drug Resistance in Cancer Revisited: The Cancer Stem Cell Hypothesis, *J. Clin. Pharmacol.* 45 (2005) 872–877.
<https://doi.org/10.1177/0091270005276905>.
- N. Novac, Challenges and opportunities of drug repositioning, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.03.004>.
- M. Pieroni, B. Wan, V. Zuliani, S.G. Franzblau, G. Costantino, M. Rivara, Discovery of antitubercular 2,4-diphenyl-1H-imidazoles from chemical library repositioning and rational design., *Eur. J. Med. Chem.* 100 (2015) 44–49.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.048>.
- A. Tamaki, C. Ierano, G. Szakacs, R.W. Robey, S.E. Bates, The controversial role of ABC transporters in clinical oncology, *Essays Biochem.* 50 (2011) 209–232.
<https://doi.org/10.1042/bse0500209>.
- C.-P. Wu, S.-H. Hsiao, Y.-H. Huang, L.-C. Hung, Y.-J. Yu, Y.-T. Chang, T.-H. Hung, Y.-S. Wu, Sitravatinib Sensitizes ABCB1- and ABCG2-Overexpressing Multidrug-Resistant Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs, *Cancers (Basel)*. 12 (2020).
<https://doi.org/10.3390/cancers12010195>.
- Z. Shi, A.K. Tiwari, S. Shukla, R.W. Robey, S. Singh, I.-W. Kim, S.E. Bates, X. Peng, I. Abraham, S. V Ambudkar, T.T. Talele, L.-W. Fu, Z.-S. Chen, Sildenafil Reverses

- ABCB1- and ABCG2-Mediated Chemotherapeutic Drug Resistance, *Cancer Res.* 71 (2011) 3029–3041. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3820>.
- F. Lin, L. Hoogendijk, L. Buil, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, Sildenafil is not a useful modulator of ABCB1 and ABCG2 mediated drug resistance in vivo, *Eur. J. Cancer.* 49 (2013) 2059–2064. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.028>.
- T.J. Raub, P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design, *Mol. Pharm.* 3 (2006) 3–25. <https://doi.org/10.1021/mp0500871>.
- E. Nicolle, A. Boumendjel, S. Macalou, E. Genoux, A. Ahmed-Belkacem, P.A. Carrupt, A. Di Pietro, QSAR analysis and molecular modeling of ABCG2-specific inhibitors, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.10.004>.
- G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219–234. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>.
- T. Hegedűs, L. Órfi, A. Seprődi, A. Váradi, B. Sarkadi, G. Kéri, Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1587 (2002) 318–325. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00095-9).
- C. Özvegy-Laczka, T. Hegedűs, G. Várady, O. Ujhelly, J.D. Schuetz, A. Váradi, G. Kéri, L. Órfi, K. Németh, B. Sarkadi, High-Affinity Interaction of Tyrosine Kinase Inhibitors with the ABCG2 Multidrug Transporter, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 1485–1495. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1485>.
- C.J. Henrich, R.W. Robey, K. Takada, H.R. Bokesch, S.E. Bates, S. Shukla, S. V Ambudkar, J.B. McMahon, K.R. Gustafson, Botryllamides: Natural Product Inhibitors of ABCG2, *ACS Chem. Biol.* 4 (2009) 637–647. <https://doi.org/10.1021/cb900134c>.
- S. Shukla, H. Zaher, A. Hartz, B. Bauer, J.A. Ware, S. V Ambudkar, Curcumin Inhibits the Activity of ABCG2/BCRP1, a Multidrug Resistance-Linked ABC Drug Transporter in Mice, *Pharm. Res.* 26 (2009) 480–487. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9735-8>.
- J.A. Ellman, Design, Synthesis, and Evaluation of Small-Molecule Libraries, *Acc. Chem. Res.* 1 (1996) 132–143. <https://doi.org/10.1021/ar950190w>.
- H. Matter, K.-H. Barighaus, T. Naumann, T. Klabunde, B. Pirard, Computational Approaches Towards the Rational Design of Drug-like Compound Libraries, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 4 (2001) 453–475. <https://doi.org/10.2174/1386207013330896>.
- A. Boumendjel, S. Macalou, G. Valdameri, A. Pozza, C. Gauthier, O. Arnaud, E. Nicolle, S. Magnard, P. Falson, R. Terreux, P.-A. Carrupt, L. Payen, A. Di Pietro, Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation., *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 3387–3401. <https://doi.org/10.2174/092986711796504736>.
- A.C. Anderson, The Process of Structure-Based Drug Design, *Chem. Biol.* 10 (2003) 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.09.002>.
- Romano T. Kroemer, Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring, *Curr. Protein Pept. Sci.* 8 (2007) 312–328. <https://doi.org/10.2174/138920307781369382>.
- H. Alonso, A.A. Bliznyuk, J.E. Gready, Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design., *Med. Res. Rev.* 26 (2006) 531–568. <https://doi.org/10.1002/med.20067>.
- O. Arnaud, A. Boumendjel, A. Gèze, M. Honorat, E.L. Matera, J. Guitton, W.D. Stein, S.E. Bates, P. Falson, C. Dumontet, A. Di Pietro, L. Payen, The acridone derivative

- MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan., *Eur. J. Cancer*. 47 (2011) 640–648.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.019>.
- E. Roussel, V.-K. Tran-Nguyen, K. Bouhedjar, M.A. Dems, A. Belaidi, B. Matougui, B. Peres, A. Azioune, O. Renaudet, P. Falson, A. Boumendjel, Optimization of the chromone scaffold through QSAR and docking studies: Identification of potent inhibitors of ABCG2, *Eur. J. Med. Chem.* 184 (2019) 111772.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111772>.
- T. Briolay, T. Petithomme, M. Fouet, N. Nguyen-Pham, C. Blanquart, N. Boisgerault, Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors, *Mol. Cancer*. 20 (2021) 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01346-2>.
- M.S. Kim, M.J. Haney, Y. Zhao, V. Mahajan, I. Deygen, N.L. Klyachko, E. Inskoe, A. Piroyan, M. Sokolsky, O. Okolie, S.D. Hingtgen, A. V Kabanov, E. V Batrakova, Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12 (2016) 655–664.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>.
- F. Aqil, H. Kausar, A.K. Agrawal, J. Jeyabalan, A.-H. Kyakulaga, R. Munagala, R. Gupta, Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer., *Exp. Mol. Pathol.* 101 (2016) 12–21.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.05.013>.
- S. Ganta, M. Amiji, Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 928–939. <https://doi.org/10.1021/mp800240j>.
- N. Joubert, A. Beck, C. Dumontet, C. Denevault-Sabourin, Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade, *Pharmaceuticals*. 13 (2020).
<https://doi.org/10.3390/ph13090245>.
- C.-H. Chang, Y. Wang, M. Zalath, D. Liu, T.M. Cardillo, D.M. Goldenberg, Combining ABCG2 Inhibitors with IMMU-132, an Anti–Trop-2 Antibody Conjugate of SN-38, Overcomes Resistance to SN-38 in Breast and Gastric Cancers, *Mol. Cancer Ther.* 15 (2016) 1910–1919. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0219>.
- S. García-Alonso, A. Ocaña, A. Pandiella, Resistance to Antibody–Drug Conjugates, *Cancer Res.* 78 (2018) 2159–2165. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3671>.
- L. Homolya, T.I. Orbán, L. Csanády, B. Sarkadi, Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 154–163.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.031>.
- K.F.K. Ejendal, C.A. Hrycyna, Differential Sensitivities of the Human ATP-Binding Cassette Transporters ABCG2 and P-Glycoprotein to Cyclosporin A, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 902–911. <https://doi.org/10.1124/mol.104.001701>.
- R.W. Robey, K. Steadman, O. Polgar, K. Morisaki, M. Blayney, P. Mistry, S.E. Bates, Pheophorbide a Is a Specific Probe for ABCG2 Function and Inhibition, *Cancer Res.* 64 (2004) 1242–1246. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3298>.
- E. Wang, C.N. Casciano, R.P. Clement, W.W. Johnson, Cholesterol Interaction with the Daunorubicin Binding Site of P-Glycoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 909–916. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3554>.
- G.P. Tegos, A.M. Evangelisti, J.J. Strouse, O. Ursu, C. Bologa, L.A. Sklar, A high throughput flow cytometric assay platform targeting transporter inhibition, *Drug Discov. Today Technol.* 12 (2014) e95–e103.
<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.03.010>.
- F. Förster, A. Volz, G. Fricker, Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a

- fluorescent microplate assay system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.10.003>.
- B. Bauer, D.S. Miller, G. Fricker, Compound Profiling for P-Glycoprotein at the Blood–Brain Barrier Using a Microplate Screening System, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1170–1176. <https://doi.org/10.1023/A:1025040712857>.
- T. Frgala, O. Kalous, R.T. Proffitt, C.P. Reynolds, A fluorescence microplate cytotoxicity assay with a 4-log dynamic range that identifies synergistic drug combinations, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 886–897. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0331>.
- G. Szakács, A. Váradi, C. Özvegy-Laczka, B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox), *Drug Discov. Today*. 13 (2008) 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>.
- E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, Interference by Anti-Cancer Chemotherapeutic Agents in the MTT-Tumor Chemosensitivity Assay, *Chemotherapy*. 50 (2004) 43–50. <https://doi.org/10.1159/000077285>.
- M.C. Alley, D.A. Scudiero, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay., *Cancer Res.* 48 (1988) 589–601. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/48/3/589>.
- H. Mueller, M.U. Kassack, M. Wiese, Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines, *J. Biomol. Screen.* 9 (2004) 506–515. <https://doi.org/10.1177/1087057104265386>.
- M.D. Hall, M.D. Handley, M.M. Gottesman, Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.003>.
- C. Özvegy-Laczka, G. Várady, G. Köblös, O. Ujhelly, J. Cervenak, J.D. Schuetz, B.P. Sorrentino, G.J. Koomen, A. Váradi, K. Német, B. Sarkadi, Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4219–4227. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411338200>.
- Á. Telbisz, C. Hegedüs, C. Özvegy-Laczka, K. Goda, G. Várady, Z. Takáts, E. Szabó, B.P. Sorrentino, A. Váradi, B. Sarkadi, Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.021>.
- M. Murakami, S. Ohnuma, M. Fukuda, E.E. Chufan, K. Kudoh, K. Kanehara, N. Sugisawa, M. Ishida, T. Naitoh, H. Shibata, Y. Iwabuchi, S. V Ambudkar, M. Unno, Synthetic Analogs of Curcumin Modulate the Function of Multidrug Resistance-Linked ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2, *Drug Metab. Dispos.* 45 (2017) 1166–1177. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.076000>.
- P.-R. Ding, A.K. Tiwari, S. Ohnuma, J.W.K.K. Lee, X. An, C.-L. Dai, Q.-S. Lu, S. Singh, D.-H. Yang, T.T. Talele, S. V Ambudkar, Z.-S. Chen, The Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Is a Potent Inhibitor of ABCB1/P-Glycoprotein Transporter, *PLoS One*. 6 (2011) e19329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019329>.
- A. Pozza, J.M. Préz-Victoria, A. Di Pietro, Overexpression of homogeneous and active ABCG2 in insect cells, *Protein Expr. Purif.* 63 (2009) 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.021>.
- S. V Ambudkar, Drug-stimulatable ATPase activity in crude membranes of human MDR1-transfected mammalian cells, in: *ABC Transp. Biochem. Cell. Mol. Asp.*, Academic Press, 1998: pp. 504–514. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)92039-](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)92039-)

0.

- G.J. Gozzi, Z. Bouaziz, E. Winter, N. Daflon-Yunes, M. Honorat, N. Guragossian, C. Marminon, G. Valdameri, A. Bollacke, J. Guillon, N. Pinaud, M. Marchivie, S.M. Cadena, J. Jose, M. Le Borgne, A. Di Pietro, Phenolic indeno[1,2-b]indoles as ABCG2-selective potent and non-toxic inhibitors stimulating basal ATPase activity., *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 3481–3495. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84982>.
- S. Lusvarghi, S. V Ambudkar, ATP-dependent thermostabilization of human P-glycoprotein (ABCB1) is blocked by modulators, *Biochem. J.* 476 (2019) 3737–3750. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190736>.
- H. Abi Hussein, C. Geneix, M. Petitjean, A. Borrel, D. Flatters, A.-C. Camproux, Global vision of druggability issues: applications and perspectives., *Drug Discov. Today.* 22 (2017) 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.021>.
- C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- F. Antoni, D. Wifling, G. Bernhardt, Water-soluble inhibitors of ABCG2 (BCRP) – A fragment-based and computational approach, *Eur. J. Med. Chem.* 210 (2021) 112958. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112958>.
- M. Nishiyama, T. Kuga, Central Effects of the Neurotropic Mycotoxin Fumitremorgin A in the Rabbit (I) Effects on the Spinal Cord, *Jpn. J. Pharmacol.* 50 (1989) 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0021-5198\(19\)42469-4](https://doi.org/10.1016/S0021-5198(19)42469-4).
- G. Valdameri, E. Genoux-Bastide, B. Peres, C. Gauthier, J. Guitton, R. Terreux, S.M.B. Winnischofer, M.E.M. Rocha, A. Boumendjel, A. Di Pietro, Substituted chromones as highly-potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein., *J. Med. Chem.* (2011). <https://doi.org/10.1021/jm201404w>.
- M. Honorat, J. Guitton, C. Gauthier, C. Bouard, F. Lecerf-Schmidt, B. Peres, R. Terreux, H. Gervot, C. Rioufol, A. Boumendjel, A. Puisieux, A. Di Pietro, L. Payen, MBL-II-141, a chromone derivative, enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts, *Oncotarget.* 5 (2014) 11957–11970. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2566>.
- D. Peña-Solórzano, S.A. Stark, B. König, C.A. Sierra, C. Ochoa-Puentes, ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators, *Med. Res. Rev.* 37 (2017) 987–1050. <https://doi.org/10.1002/med.21428>.
- A. Pick, M. Wiese, Tyrosine Kinase Inhibitors Influence ABCG2 Expression in EGFR-Positive MDCK BCRP Cells via the PI3K/Akt Signaling Pathway, *ChemMedChem.* 7 (2012) 650–662. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100543>.
- C. Özvegy, T. Litman, G. Szakács, Z. Nagy, S. Bates, A. Váradi, B. Sarkadi, Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 111–117. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5130>.
- K.F.K. Ejendal, N.K. Diop, L.C. Schweiger, C.A. Hrycyna, The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding, *Protein Sci.* 15 (2006) 1597–1607. <https://doi.org/10.1110/ps.051998406>.
- L.C. Vesga, T. Kronenberger, A.K. Tonduru, D.H. Kita, I.F. Zattoni, C.C. Bernal, A.R.R. Bohórquez, S.C. Mendez-Sánchez, S. V Ambudkar, G. Valdameri, A. Poso, Tetrahydroquinoline/4,5-Dihydroisoxazole Molecular Hybrids as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2), *ChemMedChem.* 16 (2021) 2686–2694. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100188>.

- B. Poller, D. Iusuf, R.W. Sparidans, E. Wagenaar, J.H. Beijnen, A.H. Schinkel, Differential Impact of P-Glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) on Axitinib Brain Accumulation and Oral Plasma Pharmacokinetics, *Drug Metab. Dispos.* 39 (2011) 729–735. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.037317>.
- E. Wolmarans, S. Nel, C. Durandt, J. Mellet, M.S. Pepper, Side Population: Its Use in the Study of Cellular Heterogeneity and as a Potential Enrichment Tool for Rare Cell Populations, *Stem Cells Int.* 2018 (2018) 2472137. <https://doi.org/10.1155/2018/2472137>.
- W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak, Stem cells: past, present, and future, *Stem Cell Res. Ther.* 10 (2019) 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
- T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*. 414 (2001) 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>.
- M. Baumann, M. Krause, R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance, *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 545–554. <https://doi.org/10.1038/nrc2419>.
- M. Shimoda, M. Ota, Y. Okada, Isolation of Cancer Stem Cells by Side Population Method, in: G. Papaccio, V. Desiderio (Eds.), *Cancer Stem Cells*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 49–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_5.
- T.B. Steinbichler, D. Savic, J. Dudás, I. Kvitsaridze, S. Skvortsov, H. Riechelmann, I.-I. Skvortsova, Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread, *Semin. Cancer Biol.* 60 (2020) 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.007>.
- Y. Shiozawa, B. Nie, K.J. Pienta, T.M. Morgan, R.S. Taichman, Cancer Stem Cells and their Role in Metastasis, *Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.014>.
- E.D. Williams, D. Gao, A. Redfern, E.W. Thompson, Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis, *Nat. Rev. Cancer*. 19 (2019) 716–732. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>.
- A. Biddle, X. Liang, L. Gammon, B. Fazil, L.J. Harper, H. Emich, D.E. Costea, I.C. Mackenzie, Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative, *Cancer Res.* 71 (2011) 5317–5326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1059>.
- I. Baccelli, A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Bäuerle, M. Wallwiener, T. Holland-Letz, T. Höfner, M. Sprick, M. Scharpf, F. Marmé, H.P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert, A. Trumpp, Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 539–544. <https://doi.org/10.1038/nbt.2576>.
- A. Shervington, C. Lu, Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells, *Cancer Invest.* 26 (2008) 535–542. <https://doi.org/10.1080/07357900801904140>.
- T. Nakanishi, S. Chumsri, N. Khakpour, A.H. Brodie, B. Leyland-Jones, A.W. Hamburger, D.D. Ross, A.M. Burger, Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling, *Br. J. Cancer*. 102 (2010) 815–826. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605553>.
- M. Dean, T. Fojo, S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance, *Nat. Rev. Cancer*. 5 (2005) 275–284. <https://doi.org/10.1038/nrc1590>.
- W. Chen, J. Dong, J. Haiech, M.-C. Kilhoffer, M. Zeniou, Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy, *Stem Cells Int.*

- 2016 (2016) 1740936. <https://doi.org/10.1155/2016/1740936>.
- I. Baccelli, A. Trumpp, The evolving concept of cancer and metastasis stem cells, *J. Cell Biol.* 198 (2012) 281–293. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202014>.
- S. Zhou, J.D. Schuetz, K.D. Bunting, A.M. Colapietro, J. Sampath, J.J. Morris, I. Lagutina, G.C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, B.P. Sorrentino, 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.* 7 (2001) 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>.
- C.W. Scharenberg, M.A. Harkey, B. Torok-Storb, The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors, *Blood.* 99 (2002) 507–512. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.2.507>.
- M.A. Goodell, K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, R.C. Mulligan, Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1797–1806. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1797>.
- G.A. Challen, M.H. Little, A side order of stem cells: the SP phenotype, *Stem Cells.* 24 (2006) 3–12. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0116>.
- N.S. Wolf, A. Koné, G. V Priestley, S.H. Bartelmez, In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection., *Exp. Hematol.* 21 (1993) 614–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8513861>.
- C. Hu, H. Li, J. Li, Z. Zhu, S. Yin, X. Hao, M. Yao, S. Zheng, J. Gu, Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling, *Carcinogenesis.* 29 (2008) 2289–2297. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn223>.
- J. Wang, L.-P. Guo, L.-Z. Chen, Y.-X. Zeng, S.H. Lu, Identification of Cancer Stem Cell-Like Side Population Cells in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line, *Cancer Res.* 67 (2007) 3716–3724. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4343>.
- C.P. Wu, L. Zhou, M. Xie, H.D. Du, J. Tian, S. Sun, J.Y. Li, Identification of cancer stem-like side population cells in purified primary cultured human laryngeal squamous cell carcinoma epithelia, *PLoS One.* 8 (2013) e65750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065750>.
- S.-N. Zhang, F.-T. Huang, Y.-J. Huang, W. Zhong, Z. Yu, Characterization of a Cancer Stem Cell-Like Side Population Derived from Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells, *Tumori J.* 96 (2018) 985–992. <https://doi.org/10.1177/548.6520>.
- S. Singh, J. Trevino, N. Bora-Singhal, D. Coppola, E. Haura, S. Altioik, S.P. Chellappan, EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer, *Mol. Cancer.* 11 (2012) 73. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-73>.
- L. Hu, C. McArthur, R.B. Jaffe, Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant, *Br. J. Cancer.* 102 (2010) 1276–1283. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605626>.
- L. Moserle, M. Ghisi, A. Amadori, S. Indraccolo, Side population and cancer stem cells: Therapeutic implications, *Cancer Lett.* 288 (2010) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.020>.
- L. Yang, P. Shi, G. Zhao, J. Xu, W. Peng, J. Zhang, G. Zhang, X. Wang, Z. Dong, F. Chen, H. Cui, Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020) 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>.
- M. Dean, ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells, *J. Mammary*

- Gland Biol. Neoplasia. 14 (2009) 3–9. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9109-9>.
- I.F. Emery, A. Gopalan, S. Wood, K. Chow, C. Battelli, J. George, H. Blaszyk, J. Florman, K. Yun, Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas, J. Neurooncol. 133 (2017) 47–57. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2422-z>.
- W. Yin, D. Xiang, T. Wang, Y. Zhang, C. V Pham, S. Zhou, G. Jiang, Y. Hou, Y. Zhu, Y. Han, L. Qiao, P.H.-L. Tran, W. Duan, The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells, Sci. Rep. 11 (2021) 10791. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89931-9>.
- M. Maliepaard, M.A. van Gastelen, L.A. de Jong, D. Pluim, R.C. van Waardenburg, M.C. Ruevekamp-Helmers, B.G. Floot, J.H. Schellens, Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line., Cancer Res. 59 (1999) 4559–63. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/59/18/4559>.
- A. Sauerbrey, W. Sell, D. Steinbach, A. Voigt, F. Zintl, Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia, Br. J. Haematol. 118 (2002) 147–150. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03550.x>.
- H. Shu, B. Yuan, Y. Huang, L. Wang, B. He, Q. Sun, L. Sun, High expression of ABCG2 is associated with chemotherapy resistance of osteosarcoma, J. Orthop. Surg. Res. 16 (2021) 85. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02204-z>.
- K.J. Bailey-Dell, B. Hassel, L.A. Doyle, D.D. Ross, Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene., Biochim. Biophys. Acta. 1520 (2001) 234–241. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00270-6).
- T. Nakanishi, D.D. Ross, Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression., Chin. J. Cancer. 31 (2012) 73–99. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320>.
- D. You, J.R. Richardson, L.M. Aleksunes, Epigenetic Regulation of Multidrug Resistance Protein 1 and Breast Cancer Resistance Protein Transporters by Histone Deacetylase Inhibition, Drug Metab. Dispos. 48 (2020) 459–480. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.089953>.
- L. Gorczyca, L.M. Aleksunes, Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: a review across tissues and species., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 16 (2020) 239–253. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1732348>.
- X. An, C. Sarmiento, T. Tan, H. Zhu, Regulation of multidrug resistance by microRNAs in anti-cancer therapy., Acta Pharm. Sin. B. 7 (2017) 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.09.002>.
- S. Haenisch, A.N. Werk, I. Cascorbi, MicroRNAs and their relevance to ABC transporters., Br. J. Clin. Pharmacol. 77 (2014) 587–596. <https://doi.org/10.1111/bcp.12251>.
- B. Sarkadi, L. Homolya, T. Hegedűs, The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology, FEBS Lett. 594 (2020) 4012–4034. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13947>.
- H. Moon, S. Kim, J. Ku, Correlation between the promoter methylation status of ATP-binding cassette sub-family G member 2 and drug sensitivity in colorectal cancer cell lines, Oncol Rep. 35 (2016) 298–306. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4342>.
- K.K.W. To, O. Polgar, L.M. Huff, K. Morisaki, S.E. Bates, Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells., Mol. Cancer Res. 6 (2008) 151–164. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0175>.
- W.-J. Yang, M.-J. Song, E.Y. Park, J.-J. Lee, J.-H. Park, K. Park, J.H. Park, H.-P.

- Kim, Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype., *Mol. Cells.* 36 (2013) 368–375. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0191-x>.
- P. Krishnamurthy, D.D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K.E. Mercer, B. Sarkadi, B.P. Sorrentino, J.D. Schuetz, The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24218–24225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313599200>.
- A. Singh, H. Wu, P. Zhang, C. Happel, J. Ma, S. Biswal, Expression of ABCG2 (BCRP) Is Regulated by Nrf2 in Cancer Cells That Confers Side Population and Chemoresistance Phenotype, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 2365–2376. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0108>.
- P.L.R. Ee, S. Kamalakaran, D. Tonetti, X. He, D.D. Ross, W.T. Beck, Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene., *Cancer Res.* 64 (2004) 1247–1251. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3583>.
- H. Wang, E.-W. Lee, L. Zhou, P.C.K. Leung, D.D. Ross, J.D. Unadkat, Q. Mao, Progesterone Receptor (PR) Isoforms PRA and PRB Differentially Regulate Expression of the Breast Cancer Resistance Protein in Human Placental Choriocarcinoma BeWo Cells, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 845–854. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041087>.
- Y. Lin, K.M. Bircsak, L. Gorczyca, X. Wen, L.M. Aleksunes, Regulation of the placental BCRP transporter by PPAR gamma, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31 (2017) e21880. <https://doi.org/10.1002/jbt.21880>.
- L.M. Tompkins, H. Li, L. Li, C. Lynch, Y. Xie, T. Nakanishi, D.D. Ross, H. Wang, A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells., *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1754–1761. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.016>.
- N. Albermann, F.H. Schmitz-Winnenthal, K. Z'graggen, C. Volk, M.M. Hoffmann, W.E. Haefeli, J. Weiss, Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.06.018>.
- Y. Imai, K. Ohmori, S. Yasuda, M. Wada, T. Suzuki, K. Fukuda, Y. Ueda, Breast cancer resistance protein/ABCG2 is differentially regulated downstream of extracellular signal-regulated kinase, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1118–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01154.x>.
- H. Tomiyasu, M. Watanabe, K. Sugita, Y. Goto-Koshino, Y. Fujino, K. Ohno, S. Sugano, H. Tsujimoto, Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines., *Anticancer Res.* 33 (2013) 5317–23. <https://ar.iiarjournals.org/content/33/12/5317>.
- M.M. Zhu, J.L. Tong, Q. Xu, F. Nie, X.T. Xu, S.D. Xiao, Z.H. Ran, Increased JNK1 signaling pathway is responsible for ABCG2-mediated multidrug resistance in human colon cancer., *PLoS One.* 7 (2012) e41763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041763>.
- H. Yang, Y.-C. Wei, W.-C. Li, H.-Y. Chen, H.-Y. Lin, C.-P. Chiang, H.-M. Chen, Natural Compounds Modulate Drug Transporter Mediated Oral Cancer Treatment, *Biomolecules.* 10 (2020) 1335. <https://doi.org/10.3390/biom10091335>.
- M. Scaltriti, J. Baselga, The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 5268–5272. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1554>.

- Z. Zhang, L. Yao, J. Yang, Z. Wang, G. Du, PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review), *Mol Med Rep.* 18 (2018) 3547–3554. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>.
- L. Wang, Y. Chen, P. Sternberg, J. Cai, Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 1671–1678. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1099>.
- P. Angel, M. Karin, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1072 (1991) 129–157. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(91\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90011-9).
- T. Matsuoka, M. Yashiro, Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer., *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 13756–13766. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13756>.
- X. Zhang, X. Liu, W. Zhou, M. Yang, Y. Ding, Q. Wang, R. Hu, Fasudil increases temozolomide sensitivity and suppresses temozolomide-resistant glioma growth via inhibiting ROCK2/ABCG2, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 190. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0251-9>.
- A.U. Buzdar, G.N. Hortobagyi, Tamoxifen and toremifene in breast cancer: comparison of safety and efficacy., *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 348–353. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.348>.
- Y. Zhang, H. Wang, L. Wei, G. Li, J. Yu, Y. Gao, P. Gao, X. Zhang, F. Wei, D. Yin, G. Zhou, Transcriptional modulation of BCRP gene to reverse multidrug resistance by toremifene in breast adenocarcinoma cells., *Breast Cancer Res. Treat.* 123 (2010) 679–689. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0660-2>.
- M. Honorat, A. Mesnier, A. Di Pietro, V. Lin, P. Cohen, C. Dumontet, L. Payen, Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 (2008) 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.149>.
- M. Zhang, A. Mathur, Y. Zhang, S. Xi, S. Atay, J.A. Hong, N. Datrice, T. Upham, C.D. Kemp, R.T. Ripley, G. Wiegand, I. Avital, P. Fetsch, H. Mani, D. Zlott, R. Robey, S.E. Bates, X. Li, M. Rao, D.S. Schrupp, Mithramycin represses basal and cigarette smoke-induced expression of ABCG2 and inhibits stem cell signaling in lung and esophageal cancer cells., *Cancer Res.* 72 (2012) 4178–4192. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3983>.
- K.K.W. To, R. Robey, Z. Zhan, L. Bangiolo, S.E. Bates, Upregulation of ABCG2 by Romidepsin via the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway, *Mol. Cancer Res.* 9 (2011) 516–527. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0270>.
- S. Shankar, D. Nall, S.-N. Tang, D. Meeker, J. Passarini, J. Sharma, R.K. Srivastava, Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and KrasG12D Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition, *PLoS One.* 6 (2011) e16530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016530>.
- E.T. Valera, M.A.A. de F. Cortez, R.G. de P. Queiroz, F.M. de Oliveira, M.S. Brassesco, N. Jabado, D. Faury, M.S. Bobola, H.R. Machado, C.A. Scrideli, L.G. Tone, Pediatric glioblastoma cell line shows different patterns of expression of transmembrane ABC transporters after in vitro exposure to vinblastine, *Child's Nerv. Syst.* 25 (2009) 39–45. <https://doi.org/10.1007/s00381-008-0740-3>.
- J. Bin Kim, E. Ko, W. Han, I. Shin, S.Y. Park, D.Y. Non, Berberine diminishes the side population and ABCG2 transporter expression in MCF-7 breast cancer cells, *Planta Med.* 74 (2008) 1693–1700. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088313>.
- S. Wen, S. Su, B. Liou, C. Lin, K. Lee, Sulbactam-enhanced cytotoxicity of

- doxorubicin in breast cancer cells, *Cancer Cell Int.* 18 (2018) 128.
<https://doi.org/10.1186/s12935-018-0625-9>.
- S. Feng, Z. Zheng, L. Feng, L. Yang, Z. Chen, Y. Lin, Y. Gao, Y. Chen, Proton pump inhibitor pantoprazole inhibits the proliferation, self-renewal and chemoresistance of gastric cancer stem cells via the EMT/ β -catenin pathways, *Oncol Rep.* 36 (2016) 3207–3214. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5154>.
- S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J.-Å. Gustafsson, Mechanisms of Estrogen Action, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 1535–1565.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>.
- Y. Zhang, G. Zhou, H. Wang, X. Zhang, F. Wei, Y. Cai, D. Yin, Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17 β -estradiol in ER α -positive MCF-7 breast cancer cells., *Oncology.* 71 (2006) 446–455.
<https://doi.org/10.1159/000108594>.
- H. Wang, L. Zhou, A. Gupta, R.R. Vethanayagam, Y. Zhang, J.D. Unadkat, Q. Mao, Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells, *Am. J. Physiol. Metab.* 290 (2006) E798–E807.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00397.2005>.
- H. Wang, J.D. Unadkat, Q. Mao, Hormonal regulation of BCRP expression in human placental BeWo cells., *Pharm. Res.* 25 (2008) 444–452.
<https://doi.org/10.1007/s11095-007-9432-z>.
- W. Huang, C. Wan, Q. Luo, Z. Huang, Q. Luo, Genistein-inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer., *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3432–3443. <https://doi.org/10.3390/ijms15033432>.
- K.M. Bircsak, V. Gupta, P.Y.S. Yuen, L. Gorczyca, B.I. Weinberger, A.M. Vetrano, L.M. Aleksunes, Genetic and Dietary Regulation of Glyburide Efflux by the Human Placental Breast Cancer Resistance Protein Transporter., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 357 (2016) 103–113. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.230185>.
- H. Wang, C.-H. Chi, Y. Zhang, B. Shi, R. Jia, B.-J. Wang, Effects of histone deacetylase inhibitors on ATP-binding cassette transporters in lung cancer A549 and colorectal cancer HCT116 cells., *Oncol. Lett.* 18 (2019) 63–71.
<https://doi.org/10.3892/ol.2019.10319>.
- G. Szakács, J.-P. Annereau, S. Lababidi, U. Shankavaram, A. Arciello, K.J. Bussey, W. Reinhold, Y. Guo, G.D. Kruh, M. Reimers, J.N. Weinstein, M.M. Gottesman, Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells, *Cancer Cell.* 6 (2004) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>.
- Z. Bartos, L. Homolya, Identification of Specific Trafficking Defects of Naturally Occurring Variants of the Human ABCG2 Transporter, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 40. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.615729>.
- O. Móznér, Z. Bartos, B. Zámbo, L. Homolya, T. Hegedűs, B. Sarkadi, Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism., *Cells.* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8101215>.
- K. Wakabayashi, H. Nakagawa, A. Tamura, S. Koshiba, K. Hoshijima, M. Komada, T. Ishikawa, Intramolecular Disulfide Bond Is a Critical Check Point Determining Degradative Fates of ATP-binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 Protein, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27841–27846. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700133200>.
- H. Nakagawa, K. Wakabayashi-Nakao, A. Tamura, Y. Toyoda, S. Koshiba, T. Ishikawa, Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2, *FEBS J.* 276 (2009) 7237–7252. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07423.x>.

- R.R. Kopito, ER Quality Control: The Cytoplasmic Connection, *Cell*. 88 (1997) 427–430. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81881-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81881-4).
- W. Mo, J.-T. Zhang, Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance., *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3 (2012) 1–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509477>.
- Z. Erdei, B. Sarkadi, A. Brózik, K. Szabó, G. Várady, V. Makó, A. Péntek, T.I. Orbán, Á. Apáti, Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response, *Eur. Biophys. J.* 42 (2013) 169–179. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0838-0>.
- H. Komori, K. Yamada, I. Tamai, Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.006>.
- M. Studzian, G. Bartosz, L. Pulaski, Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: trafficking mechanisms and intracellular fate, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1759–1771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.011>.
- H. Peng, Z. Dong, J. Qi, Y. Yang, Y. Liu, Z. Li, J. Xu, J.-T. Zhang, A Novel Two Mode-Acting Inhibitor of ABCG2-Mediated Multidrug Transport and Resistance in Cancer Chemotherapy, *PLoS One*. 4 (2009) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005676>.
- H. Peng, J. Qi, Z. Dong, J.-T. Zhang, Dynamic vs Static ABCG2 Inhibitors to Sensitize Drug Resistant Cancer Cells, *PLoS One*. 5 (2010) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015276>.
- Y. Imai, E. Ishikawa, S. Asada, Y. Sugimoto, Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2., *Cancer Res.* 65 (2005) 596–604. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/65/2/596>.
- A.M.S. Hartz, E.K. Madole, D.S. Miller, B. Bauer, Estrogen receptor beta signaling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (2010) 467–476. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168930>.
- Y. Wei, Y. Ma, Q. Zhao, Z. Ren, Y. Li, T. Hou, H. Peng, New Use for an Old Drug: Inhibiting ABCG2 with Sorafenib, *Mol. Cancer Ther.* 11 (2012) 1693–1702. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0215>.
- T. Nakanishi, K. Shiozawa, B.A. Hassel, D.D. Ross, Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression, *Blood*. 108 (2006) 678–684. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4020>.
- M. Dohse, C. Scharenberg, S. Shukla, R.W. Robey, T. Volkmann, J.F. Deeken, C. Brendel, S. V Ambudkar, A. Neubauer, S.E. Bates, Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib., *Drug Metab. Dispos.* 38 (2010) 1371–1380. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031302>.
- S. Aust, P. Obrist, W. Jaeger, M. Klimpfinger, G. Tucek, F. Wrba, E. Penner, T. Thalhammer, Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium, *Lab. Invest.* 84 (2004) 1024–1036. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700127>.
- A.-M. Bleau, D. Hambardzumyan, T. Ozawa, E.I. Fomchenko, J.T. Huse, C.W. Brennan, E.C. Holland, PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population

- phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells., *Cell Stem Cell.* 4 (2009) 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007>.
- J. Zhang, J. Hu, W. Li, C. Zhang, P. Su, Y. Wang, W. Sun, X. Wang, L. Li, X. Wu, Rapamycin Antagonizes BCRP-Mediated Drug Resistance Through the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in mPR α -Positive Breast Cancer., *Front. Oncol.* 11 (2021) 608570. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.608570>.
- B. Fischer, C. Frei, U. Moura, R. Stahel, E. Felley-Bosco, Inhibition of phosphoinositide-3 kinase pathway down regulates ABCG2 function and sensitizes malignant pleural mesothelioma to chemotherapy, *Lung Cancer.* 78 (2012) 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.07.005>.
- K.K.W. To, B. Tomlinson, Targeting the ABCG2-overexpressing multidrug resistant (MDR) cancer cells by PPAR γ agonists., *Br. J. Pharmacol.* 170 (2013) 1137–1151. <https://doi.org/10.1111/bph.12367>.
- M. Mogi, J. Yang, J.-F. Lambert, G.A. Colvin, I. Shiojima, C. Skurk, R. Summer, A. Fine, P.J. Quesenberry, K. Walsh, Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39068–39075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306362200>.
- C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F. Brown, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5241–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106507>.
- E.H. Walker, M.E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wymann, R.L. Williams, Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine, *Mol. Cell.* 6 (2000) 909–919. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00089-4).
- T. Takada, H. Suzuki, Y. Gotoh, Y. Sugiyama, Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of AKT in polarized cells, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 905–909. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003228>.
- Y. Imai, M. Yoshimori, K. Fukuda, H. Yamagishi, Y. Ueda, The PI3K/Akt inhibitor LY294002 reverses BCRP-mediated drug resistance without affecting BCRP translocation., *Oncol. Rep.* 27 (2012) 1703–1709. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1724>.
- S.-M. Maira, F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chène, A. De Pover, K. Schoemaker, D. Fabbro, D. Gabriel, M. Simonen, L. Murphy, P. Finan, W. Sellers, C. García-Echeverría, Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity., *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1851–1863. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0017>.
- R. Ding, B.A. Kamen, J. Shi, K.W. Scotto, Regulation of ABCG2 lysosomal degradation by xanthines: Role of the PI3K/AKT pathway., *Cancer Res.* 73 (2013) 992. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2013-992>.
- H. Wang, L. Zhou, A. Gupta, R.R. Vethanayagam, Y. Zhang, J.D. Unadkat, Q. Mao, Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290 (2006) E798–807. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00397.2005>.
- T. Kobori, S. Harada, K. Nakamoto, S. Tokuyama, Activation of ERM-Family Proteins via RhoA-ROCK Signaling Increases Intestinal P-gp Expression and Leads to Attenuation of Oral Morphine Analgesia, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 1095–1105.

<https://doi.org/10.1002/jps.23441>.

T. Kano, S. Wada, K. Morimoto, Y. Kato, T. Ogihara, Effect of Knockdown of Ezrin, Radixin, and Moesin on P-Glycoprotein Function in HepG2 Cells, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 5308–5314. <https://doi.org/10.1002/jps.22718>.

S.M. Banik, K. Pedram, S. Wisnovsky, G. Ahn, N.M. Riley, C.R. Bertozzi, Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins, *Nature*. 584 (2020) 291–297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2545-9>.

CAPÍTULO 2

Este capítulo consiste em um projeto relacionando os medicamentos usados no tratamento da COVID-19 com o transportador ABCG2. Avaliamos a possibilidade destes medicamentos serem substratos ou inibidores. Para os medicamentos que apresentaram inibição, propusemos o mecanismo envolvido.

Structural and molecular characterization of lopinavir and ivermectin as ABCG2 inhibitors

Julia de Paula Dutra¹, Gustavo Scheiffer¹, Thales Kronenberger^{2,3}, Lucas Julian Cruz Gomes¹, Isadora Zanzarini¹, Kelly Karoline dos Santos¹, Arun K. Tonduru², Antti Poso^{2,3}, Fabiane Gomes de Moraes Rego⁴, Geraldo Pichet⁴, Glaucio Valdameri¹, Vivian Rotuno Moure^{1*}

¹Pharmaceutical Sciences Graduation Program, Laboratory of Cancer Drug Resistance, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

²School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, P.O. Box 1627, FI-70211 Kuopio, Finland.

³a Department of Internal Medicine VIII, University Hospital Tuebingen, Otfried-Müller-Strasse 14, Tuebingen DE 72076, Germany. b Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Eberhard-Karls-Universität, Tuebingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tuebingen, Germany. c Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) “Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies”, University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany. d Tuebingen Center for Academic Drug Discovery & Development (TüCAD2), 72076 Tuebingen, Germany.

⁴Pharmaceutical Sciences Graduation Program, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

*Corresponding author: Vivian Rotuno Moure, E-mail: vivian.moure@ufpr.br

ABSTRACT

A current clinical challenge in cancer is the multidrug resistance (MDR) mediated by ABC transporters. ABCG2 transporter is one of the at least three ABC transporters implicated in MDR and the use of inhibitors is a promising approach. This study aimed the characterization of the molecular mechanism of ABCG2 inhibitors identified by a repurposing drug strategy using COVID-19 drug candidates. Lopinavir and ivermectin inhibited ABCG2 activity showing IC₅₀ values of 25.5 and 23.4 μ M, respectively. These drugs were highly cytotoxic and not transported by ABCG2. Additionally, these drugs increased the 5D3 antibody binding and did not affect the mRNA and protein

expression levels. Cell-based analysis of the type of inhibition suggested a non-competitive inhibition, that was confirmed by *in silico* approaches of molecular docking and molecular dynamic simulations. These results showed an overlap of the lopinavir and ivermectin binding sites on ABCG2, mainly interacting with E446 residue. However, the substrate mitoxantrone occupies a different site, binding to the F436 region, closer to the L554/555 plug. In conclusion, these results revealed the mechanistic basis of lopinavir and ivermectin interaction with ABCG2.

1. Introduction

Most of cancer treatment protocols include chemotherapy, however, the development of resistance is responsible for the lower objective response rate observed with the classical protocols (GOTTESMAN *et al.*, 2016). The development of simultaneous cross-resistance to a wide of unrelated structurally drugs is called as multidrug resistance (MDR) (SZAKACS *et al.*, 2006). The MDR phenomenon in cancer can be categorized as intrinsic (pre-existing) or acquired, triggered by drug exposure (GOTTESMAN, 2002). Different strategies to overcome MDR in cancer have been proposed, albeit it remains an important oncological challenge, since several cellular mechanisms are involved in MDR, including the inactivation of the drug, enhanced DNA repair, mutations or altered expression levels of the biological target, drug compartmentalization, altered mitochondria, failure of programmed cell death and overexpression of ABC transporters (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; HALL; HANDLEY, 2009; GOTTESMAN, 2009; SZAKÁCS *et al.*, 2014).

The human genome encodes 48 ABC proteins, most of them transporters that promote the efflux of substrates mediated by ATP binding and hydrolysis (DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 1998). ABC transporters show important physiological functions, pumping xenobiotics out of cells to protected them of damage, illustrating their localization in sanctuaries sites in our body, such as blood-brain barrier (BBB), blood-testis barrier and blood-placental barrier (ROBEY *et al.*, 2018). In cancer cells, three ABC transporters are considered most relevant, with undoubtedly association with chemotherapeutic treatment failure: P-glycoprotein (P-gp or MDR1, encoded by *ABCB1*), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1, encoded by

ABCC1) and breast cancer resistance protein (BCRP, encoded by *ABCG2*) (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; SZAKÁCS *et al.*, 2006).

ABCG2 was discovered in 1998 by three independent research groups, receiving different names based on the biological model, including BCRP, because of its identification in a breast cancer cell line (DOYLE *et al.*, 1998), MXR from resistance caused by mitoxantrone (MIYAKE *et al.*, 1999) and ABCP, due their presence in placenta (ALLIKMETS *et al.*, 1998). Today, most literature has been used ABCG2 to unequivocally announce this transporter. Considering that the efflux inhibition consists in the most promising strategy to overcome MDR mediated by ABC transporters, more than a hundred of ABCG2 inhibitors already were identified (ZATTONI *et al.*, 2022a). The first described ABCG2 inhibitor was fumitremorgin C (FTC) (RABINDRAN *et al.*, 1998), that was used as scaffold for Ko143, considered as a reference inhibitor of ABCG2 (ALLEN *et al.*, 2002). The current list of ABCG2 inhibitors includes several classes of compounds, including chalcones (VALDAMERI *et al.*, 2012a), indenoindoles (KITA *et al.*, 2021), stilbenes (VALDAMERI *et al.*, 2012b), tetrahydroquinoline/4,5-dihydroisoxazole hybrids (VESGA *et al.*, 2021) chromones (VALDAMERI *et al.*, 2012c) and others, that can be classified as specific toward ABCG2, dual or pan-inhibitors (ZATTONI *et al.*, 2022a).

Drug repurposing is an interesting and attractive strategy for rapid identification of potential ABCG2 inhibitors from existing medicines, that possess distinct molecular targets and having already been tested safe in humans (SHIM; LIU, 2014; ZATTONI *et al.*, 2022a). Several classes of drugs already were screened as ABCG2 inhibitors, including antibiotics, antifungals, anti-HIV, calcium channel blockers, glucocorticoids and tyrosine kinase inhibitors (BOUMENDJEL *et al.*, 2011; JUVALE; WIESE, 2015; ZATTONI *et al.*, 2022a). Among the few potent ABCG2 inhibitors that shows IC₅₀ values in the nanomolar range, some were identified by drug repurposing, such as tivozanib, fostamatinib, ponatinib and febuxostat (ZATTONI *et al.*, 2022a). The identification of febuxostat as a potent ABCG2 inhibitor highlight the potential of this approach, once the blood plasm concentration (90 nM) observed in the dose used to treat chronic gout is higher than the IC₅₀ value for ABCG2 inhibition (27 nM) (MIYATA *et al.*, 2016; TOYODA; TAKADA; SUZUKI, 2019). Thus, the aim of this study was to explore the molecular interaction of COVID-19 drug therapy candidates with ABCG2 transporter.

2. Material and methods

2.1 Materials

Mitoxantrone, rhodamine 123, GF120918 (Elacridar), Ko143, hydrocortisone, prednisolone, dexamethasone, ivermectin, lopinavir, hydroxychloroquine, chloroquine and oseltamivir and MTT were purchased from Sigma-Aldrich. Hoechst 33342 and TRIzol were purchased from Invitrogen. All other reagents were commercial products of the highest available purity.

2.2 Cell cultures

Human fibroblast HEK293 parental cells (wild-type) and HEK293 cells stably transfected with ABCG2 (HEK293-ABCG2), mouse fibroblast NIH3T3 parental cells (wild-type) and NIH3T3 cells stably transfected with ABCB1 (NIH3T3-P-gp) were provided by Dr. Attilio Di Pietro (IBCP, Lyon, France). All cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM high glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, and with 0.75 mg/mL G418 (HEK293-ABCG2) or 60 ng/mL colchicine (NIH3T3-P-gp) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere.

2.3 Inhibition assay

The ability of drugs to inhibit the transport function of ABC proteins was evaluated using fluorescent substrates by flow cytometry. Cells were aliquoted at a density of 1.0×10^5 cells/tube. Cells were exposed to fluorescent substrates (hoechst 33342 at 3 μ M, rhodamine 123 at 10 μ M and mitoxantrone from 2.5 to 25 μ M) with or without drugs at different concentrations, and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 45 min. The cells were centrifuged (2,000 x g for 5 min) and resuspended with 300 μ L of cold phosphate buffer saline (PBS) and kept on ice until flow cytometry analysis. Intracellular substrate fluorescence data was acquired using a FACS Celesta

(equipped with three lasers: 355, 405 and 488 nm) or a FACS Calibur (equipped with two lasers: 488 and 635 nm) flow cytometer. At least 10,000 events were collected, and the median fluorescence intensities used for the calculations. The inhibition percentage was calculated using parental cells or a reference inhibitor to achieve 100% of inhibition. In all experiments, at least three independent replicates were used and IC_{50} values were calculated by using GraphPad prism software version 6.01.

2.4 Cell viability assay

Cells were seeded (2.0×10^4 cell/well) into a 96 wells plate and incubated for 24 h to attachment. To evaluate the cell cytotoxicity by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay, were treated with increasing concentrations of drugs and incubated for 72 h. After this period, the medium was discarded and the cells monolayer washed with PBS (100 μ L), followed by incubation at 37 °C with MTT solution (100 μ L of solution 0.5 mg/mL in PBS) for 4 h. Then, the solution was discarded and the formazan crystals dissolved with 100 μ L of ethanol/DMSO (1:1). The absorbance was measured using a microplate reader at 595 nm (Bio-Rad iMark).

2.5 Conformational antibody binding (5D3) assay

The effect on the binding of a conformational antibody was determined by flow cytometry. HEK293-ABCG2 cells were cultivated at 37 °C in 5% CO₂ until approximately 90% of confluence, then detached and separated in tubes with 5×10^5 cells/tube. Cells were centrifuged at 2000 x g for 5 min and the supernatant discarded. The resulting cell pellet was suspended in PBS (100 μ L) containing 40 μ g/mL of BSA. Samples were incubated with inhibitors for 10 minutes at 37 °C. After this period, the primary antibody anti-human ABCG2 clone 5D3 (BD Pharmingen – dilution 1:100) was added to each sample and incubated for 30 min at 37 °C. Cells were centrifuged and the supernatant discarded. Cells were suspended in PBS (100 μ L) and the secondary antibody was added (anti-mouse PE, Abcam – dilution 1:200). The samples were incubated at 37 °C for 30 min, centrifuged, and the cell pellet was suspended in 300

μL of PBS. Data were recorded by flow cytometry. At least 10,000 events were collected.

2.6 RT-qPCR

Total RNA was obtained of HEK293-*ABCG2* cells from tissue flasks-25 cm² (at approximately 90% of confluence) after treatment for 72 h with lopinavir (6.25 μM) and ivermectin (1.56 μM). The total RNA isolation was performed using TRIzol (Invitrogen) protocol according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was quantified by absorbance using the NanoDrop™ Spectrophotometer and the integrity evaluated by 1% agarose gel electrophoresis. RNA was stored at -80 °C. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, and the resulting cDNA was stored at -20 °C. Using cDNAs as the template, quantitative real-time PCR was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Appliedbiosystems) in a 7500™ Real-Time PCR Detection System (Appliedbiosystems). A dissociation cycle was performed after each run to check for non-specific amplification or contamination. The mRNA expression levels were normalized using the geNorm 3.4 software, and the corresponding housekeeping gene expression levels. Sets of specific primers were designed using Primer designing tool - NCBI and validated through BLAST and BLAT, and their respective sequences are shown in Table 1. Relative expression levels were estimated using the method described by Pfaffl (PFAFFL, 2001).

Table 1 - Nucleotide sequences of primers used for RT-qPCR.

Gene	NCBI reference	Sequence	Amplicon (bp)
<i>PPIA</i>	NM_021130.5	F- TAAAGCATACGGGTCCTGGC R- TGCCATCCAACCACTCAGTC	105
<i>RPS13</i>	NM_001017.3	F- CGTCCCCACTTGGTTGAAGT R- TGAATCTCTCAGGATTACACCGA	109
<i>HPRT1</i>	NM_000194.3	F- CAGGGATTTGAATCATGTTTGTGT R- ACTCCAGATGTTTCCAAACTCAAC	98
<i>ABCG2</i>	NM_001257386.2	F - ATGGTCTGTTGGTCAATCTCAC R - TTATGCTGCAAAGCCGTAAATCC	97

2.7 Western blot

Protein was obtained of HEK293-ABCG2 cells from tissue flasks-25 cm² (at approximately 90% of confluence) after treatment for 72 h with lopinavir (6.25 µM) and ivermectin (1.56 µM) using 200 µL of RIPA+ buffer and 2 µL of 0.5 M EDTA pH 8. Protein quantification was performed by Bradford and 40 µg was separated by gel electrophoresis (8% polyacrylamide). Proteins were transferred to a PVDF membrane using a semi-dry transference system (GE Healthcare). The membrane was cut in two parts guided by the PageRuler™ Prestained Protein Ladder. The upper part of the membrane was incubated overnight (4°C) with ABCG2 antibody (BXP-21, diluted 1:500) in TBST buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M TRIS and 0.1% Tween 20) containing 1% powdered milk. The lower part of the membrane was incubated overnight (4°C) with GAPDH antibody (mAB, diluted 1:5000) in TBST buffer containing 1% powdered milk. The membranes were washed in TBST, and incubated with anti-mouse IgG HRP antibody, diluted 1:2000 in TBST containing 1% powdered milk at room temperature for 1 hour. After this incubation, the membranes are washed with TBST. ECL Plus kit substrate (GE Healthcare) was added to the membranes and exposed in a Amersham Hypefilm film (GE Healthcare) for 10 seconds.

2.8 Protein selection and preparation for *in silico* studies

ABCG2 structure with mitoxantrone was retrieved from Protein Data Bank (PDB, PDB ID 6VXI. Resolution 3.7 Å, (ORLANDO; LIAO, [s. d.]). The structure was prepared and minimized by adding hydrogens, adjusting protonation states (pH 7.4) of amino acids, and fixing missing side-chain atoms using Maestro PrepWizard 2021.4. The missing loops between K46 and E60 (N-terminal domain or NTD), S302-P327 (NTD) and G354-Y369 (connecting the transmembrane bundle and the NTD) were generated using Prime (JACOBSON *et al.*, 2004) and the final structure encompassed from A35 to S655.

2.9 Molecular docking

Subsequently, the structures had only polar hydrogens maintained and were converted to pdbqt format using the AutoDockTools 1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009). The ligands structures for ivermectin, lopinavir and mitoxantrone were downloaded from ZINC Database (STERLING; IRWIN, 2015), taken into the Avogadro software and subjected to a geometry pre-optimization using the Auto Optimization tool (MMFF94s force field) (HALGREN, 1996a, 1996b, 1996c, 1996d, 1999; HALGREN; NACHBAR, 1996), followed by visual inspection to ensure that there were no errors. Using Avogadro, the molecule file was prepared for a second geometry optimization in MOPAC2016 (STEWART; CHEMISTRY, 2016), with the semi-empirical quantum PM7 method. At the end of this step, the files were converted to the pdbqt format, also in AutoDockTools, ensuring that all torsions were set to active. For *docking*, the AutoDock Vina 1.2.3 (EBERHARDT *et al.*, 2021) was used, in which a gridbox was delimited, based on the central region in which the co-crystallized ligand was originally detected. The mitoxantrone+ lopinavir (MTX + LPV) and mitoxantrone+ ivermectin (MTX + IVT) docking was performed sequentially, using the 6VXI + MTX docked structure for the inhibitors. The atomic coordinates of the gridbox centroid for all docking experiments were defined as: X = -0.181; Y = -0.222; Z = 0.571, with a 40 Å distance on all three axes. The *exhaustiveness parameter* was set to 75 and the maximum number of results (poses) to twenty, with a maximum allowed variation of 2 kcal/mol from the first to the last conformation. After the process was performed with all molecules (substrate and inhibitors), resulting poses served as a starting point for Molecular Dynamics.

2.10 Molecular dynamics simulations

The minimized structures were submitted to molecular dynamics (MD) simulation for further refinement. Selected docking poses were further validated by MD simulation, where ligand stability within the proposed pocket and its interactions were evaluated. The MD simulations were carried out using the Desmond engine (BOWERS *et al.*, 2006) with the OPLS4 force-field (LU *et al.*, 2021). The simulated system encompassed the protein-ligand complex, a predefined water model (TIP3P, (JORGENSEN *et al.*, 1983) as a solvent, POPC membranes (automatically positioned according to the alpha-helices), and counterions (Na⁺ or Cl⁻ adjusted to neutralize the overall system charge). The system was treated in an orthorhombic box with periodic

boundary conditions specifying the shape and the size of the box as 10x10x13 Å distance from the box edges to any atom of the protein. RESPA integrator timesteps of 2 fs for bonded and near, and 6 fs for non-bonded terms far were applied. Short-range coulombic interactions were performed using a time step of 1 fs and a cut-off value of 9.0 Å, whereas long-range coulombic interactions were handled using the Smooth Particle Mesh Ewald (PME) method (DARDEN *et al.*, 1993)). Standard desmond relaxation protocol was employed. Simulations were run in the NPT ensemble, with a temperature of 310 K (Nosé-Hoover thermostat) and pressure of 1.01325 bar (Martyna-Tobias-Klein barostat). MD trajectories were visualized, and figures were produced using PyMOL v.2.5 (Schrödinger LCC, New York, NY, USA). At least three independent simulations were performed for each ligand, being 200 ns for inhibitors and 500 ns for mitoxantrone.

2.11 Trajectory Analyses and MM/GBSA

Protein-ligand interactions were determined using the simulation event analysis pipeline implemented in Maestro (Maestro v2021.4). Distance calculations were performed employing the Maestro event analysis tool (Schrödinger, LLC, New York, NY). The molecular mechanics energies with generalized Born and surface area continuum solvation (MM/GBSA) were calculated with Prime (JACOBSON *et al.*, 2004) thermal MM/GBSA script provided by Schrödinger. Each 5th frame of MD was used for MM/GMBSA calculations. Trajectories were clustered according to the ligand's RMSD values in order to select relevant conformations for discussion and figures, using the `trj_cluster.py` script provided by Schrödinger. Figures were generated using PyMOL v2.5 (Schrödinger, LLC, New York, NY).

3. Results and discussion

3.1 Identification of COVID-19 drug candidates as ABCG2 inhibitors

In order to identify ABCG2 inhibitors, a repurposing drug strategy utilizing a cell-based model was used. All the eight selected COVID-19 drug candidates were tested as ABCG2 inhibitors in stably transfected HEK293-ABCG2 cells overexpressing the ABCG2 transporter. This initial screening was performed by flow cytometry using hoechst 33342 as a fluorescent substrate of ABCG2, and all drugs were assayed at 10 and 100 μ M. Only lopinavir and ivermectin inhibited ABCG2 activity (Fig. 1A). Both drugs produced a mild inhibition effect at 10 μ M, about 25%. However, a complete inhibition (100%) was observed at 100 μ M (Fig 1A and B). The ABCG2 inhibition promoted by lopinavir (WEISS *et al.*, 2007) and ivermectin (JANI *et al.*, 2011) was already reported, and most recently, this inhibition effect was confirmed, showing IC₅₀ values (compound concentrations giving a half-maximal inhibition) of ABCG2 inhibition of 13.1 and 3.1 μ M, for lopinavir and ivermectin, respectively (TELBISZ *et al.*, 2021). Here, we observed IC₅₀ values of inhibition of 25.5 and 23.4 μ M for lopinavir and ivermectin, respectively (Fig. 1C and D). The differences among the IC₅₀ values could be associated with the substrate used in each study. Telbisz *et al* have used PhenGreen (PG)-AM as substrate of ABCG2 (TELBISZ *et al.*, 2021), while we used hoechst 33342.

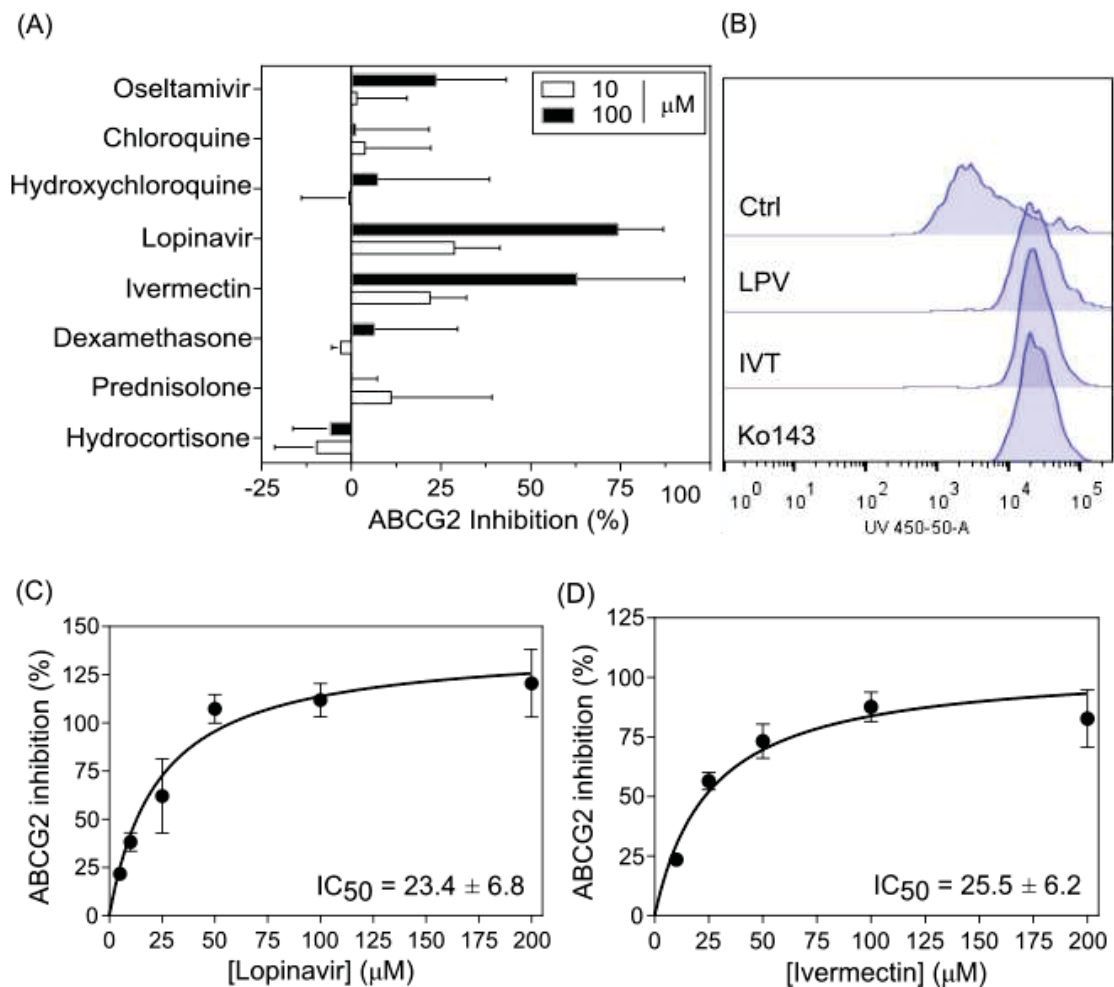


Figure 1 - ABCG2 inhibition by flow cytometry. **(A)** Screening of COVID-19 drug candidates: hydrocortisone, prednisolone, dexamethasone, ivermectin, lopinavir, hydroxychloroquine, chloroquine and oseltamivir as ABCG2 inhibitors. Drugs were tested at 10 and 100 μM on HEK293-ABCG2 cells by flow cytometry using hoechst 33342 at 3 μM. Ko143 at 1 μM was used as reference inhibitor (100% of inhibition). Data represents the mean ± SD of at least three independent experiments. **(B)** Representative histograms of control (hoechst 33342 at 3 μM alone), lopinavir 100 μM, ivermectin 100 μM and Ko143 at 1 μM conditions. **(C)** Lopinavir and **(D)** ivermectin IC₅₀ curves of ABCG2 inhibition. Data represents the mean ± SD of at least three independent experiments

The interaction of COVID-19 drug candidates already have been described for others ABC transporters, including glycoprotein P (P-gp) (TELBIŠZ *et al.*, 2021). Here, we also investigated the P-gp inhibition of these eight drugs selected using stably transfected NIH3T3-*ABCB1* cells overexpressing P-gp. In this case, rhodamine 123 was used as substrate. Interestingly, lopinavir and ivermectin also inhibited the P-gp activity (data not shown). Hydroxychloroquine at concentrations higher than 10 μM inhibited the P-gp activity, without effect on ABCG2 activity (WEISS; BAJRAKTARI-SYLEJMANI; HAEFELI, 2020). Here, we confirmed these findings, since chloroquine

and hydroxychloroquine partially inhibited the P-gp activity (data not shown), in contrast to the observed toward ABCG2 (Fig. 1A). Taken together, these results confirmed that COVID-19 drug candidates are inhibitors of ABC transporters responsible for MDR in cancer. Despite the search for specific inhibitors, the identification of dual- and pan-inhibitors is attractive (ZATTONI *et al.*, 2022a), since the clinic trials failure of specific P-gp inhibitors was partially attributed to the overlap of transported substrates among the ABC transporters (ROBEY *et al.*, 2018; TAMAKI *et al.*, 2011).

3.2 Cytotoxicity and absence of ABCG2-mediated transport of COVID-19 drug candidates

To further investigate the interaction of COVID-19 drug candidates with ABCG2, a cell viability assay was performed using wild-type and transfected cells overexpressing ABCG2. Many ABCG2 inhibitors also are recognized as ABCG2 substrates, and this effect is initially investigated by MTT assay (ZATTONI *et al.*, 2022b, 2022c). This approach is only useful for cytotoxic drugs, and a lower cytotoxic effect triggered by drugs on cells overexpressing the ABC transporter suggests a transport, in this case mediated by ABCG2. As shown in Fig. 2, all tested drugs decreased the cell viability after 72 hours of exposure. Some of these drugs, such as oseltamivir showed a very low cytotoxic effect, decreasing the cell viability only in concentrations higher than 200 μ M (Fig. 2H). In sharp contrast, lopinavir and ivermectin were highly cytotoxic, decreasing the cell viability at 12 and 3 μ M, respectively (Fig. 2D and E). Interestingly, the two COVID-19 drug candidates that inhibited ABCG2 transport activity also were the most cytotoxic agents.

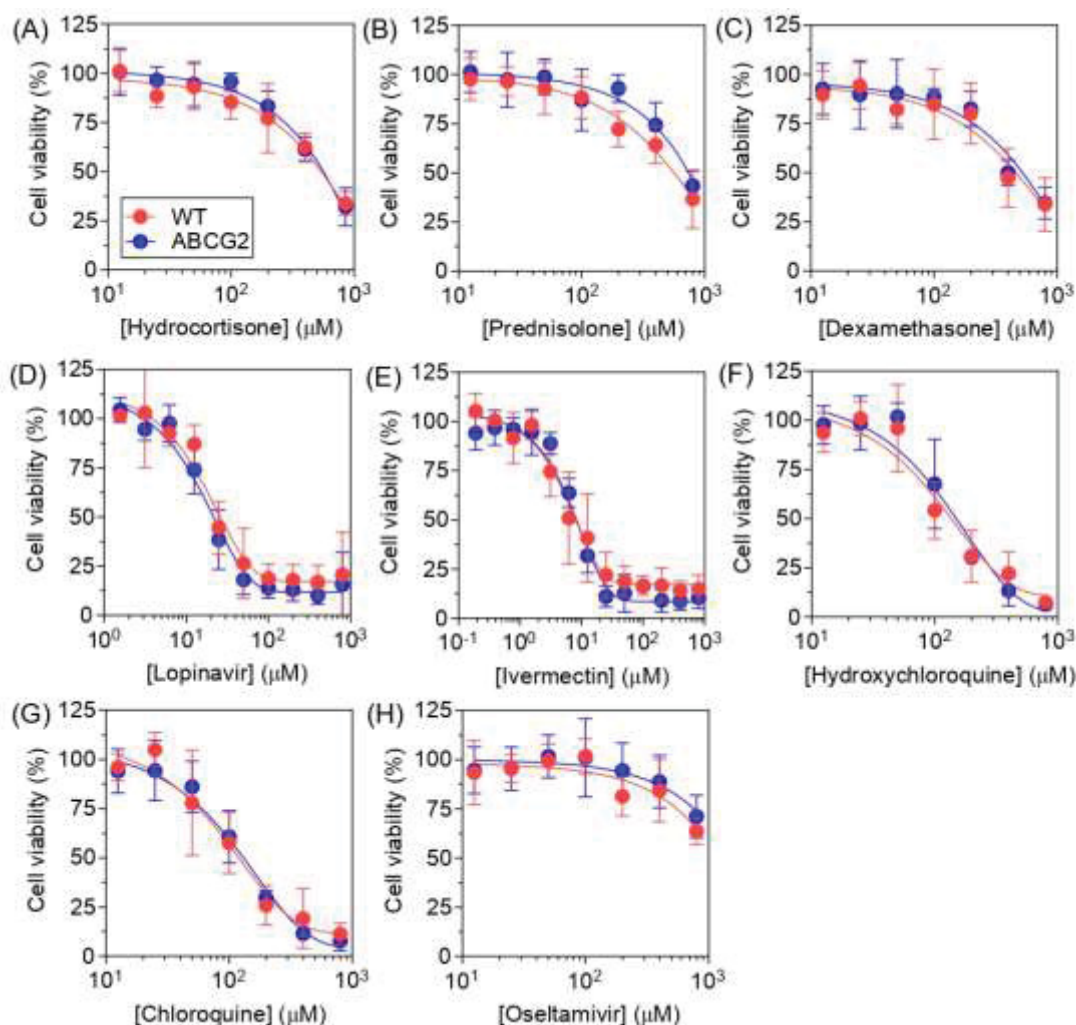


FIGURE 2 - Cytotoxicity and absence of transport mediated by ABCG2 transporter. MTT cell viability assay was performed on HEK293 wild-type and HEK293-ABCG2 cells after 72 hours of treatment with (A) hydrocortisone, (B) prednisolone, (C) dexamethasone, (D) ivermectin, (E) lopinavir, (F) hydroxychloroquine, (G) chloroquine and (H) oseltamivir. Drugs were tested at different concentrations, as indicated in the graphs and the data represents the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. Cells treated with the vehicle (DMSO or H₂O) were considered as 100% of viable cells.

The cytotoxic effect is an important parameter to be considered during the identification of ABCG2 inhibitors, since many potent inhibitors did not follow toward pre-clinical studies due to their high intrinsic cytotoxicity (BOUMENDJEL *et al.*, 2011; ZATTONI *et al.*, 2022c). To correlate the inhibition potency and cytotoxicity, the inhibitors were compared based on their therapeutic rate (IG₅₀/IC₅₀), where the IG₅₀ value is the concentration that produces 50% growth inhibition. In this way, compounds that present very high therapeutic rate (TR), such as chromone 6g (MBL-II-141), that showed a TR of 2000 (VALDAMERI *et al.*, 2012c), are considered as promising to be explored in pre-clinical models and clinical trials studies (ZATTONI *et al.*, 2022c). Here,

the calculated TR for lopinavir and ivermectin were 0.64 and 0.26, respectively (Fig. 1 C, D and Fig. 2 D, E). These very low TR values indicate that both compounds were highly cytotoxic and probably the ABCG2 inhibition effect might be not validated in animal models. However, considering a repurposing strategy, other parameter that should be considered, is the drug plasma concentration. The highest plasma concentrations described for lopinavir and ivermectin were 15 μ M (KALETRA, 2016) and 53 nM (STROMEKTOL, 2009), respectively. Together, the use of ivermectin at clinic as ABCG2 inhibitor is impracticable, however, the IC₅₀ value of ABCG2 inhibition of lopinavir is in the same order magnitude of the plasma concentrations. Considering that the most promising repurposed ABCG2 inhibitor is the febuxostat (MIYATA *et al.*, 2016; TOYODA; TAKADA; SUZUKI, 2019) because of its IC₅₀ value of 27 nM, a concentration lower than the plasma concentration (90 nM), clinical trial of ABCG2 inhibition might be followed using the clinical dose (TOYODA; TAKADA; SUZUKI, 2019).

Regarding the cytotoxic profile of the eight COVID-19 drug candidates comparing both cell lines, HEK293 wild-type and HEK293-ABCG2, no difference was evidenced (Fig. 2). This result suggests that none of these drugs are recognized as substrates of ABCG2 transporter. The absence of transport mediated by the target transporter is a desirable feature of inhibitors, becoming the lopinavir and ivermectin chemical core structures promising scaffolds for design of more potent ABCG2 inhibitors to be pursued using rational drug design strategies.

3.3 Mechanism of ABCG2 inhibition exploited by *in vitro* approaches

The interaction of drugs with ABC transporters can be studied by different *in vitro* approaches, including the use of conformational antibodies (ZATTONI *et al.*, 2022a). In the case of ABCG2 transporter, the antibody called clone 5D3 recognizes an extracellular epitope of the protein (TAYLOR *et al.*, 2017). In general, ABCG2 inhibitors induce a conformational change that increase the 5D3 binding, in contrast to ABCG2 substrates, that do not trigger this “5D3 shift” (TELBISZ *et al.*, 2012; ZATTONI *et al.*, 2022c). Lopinavir and ivermectin induced an increase on 5D3 binding, such as the ABCG2 reference inhibitor Ko143 (Fig. 3A). As shown by the histograms, the 5D3 shift is more pronounced for lopinavir and ivermectin than Ko143 (Fig. 3B). This result

agrees with our previous data that demonstrated that lopinavir and ivermectin are non-transported inhibitors of ABCG2 (Fig. 1 and 2).

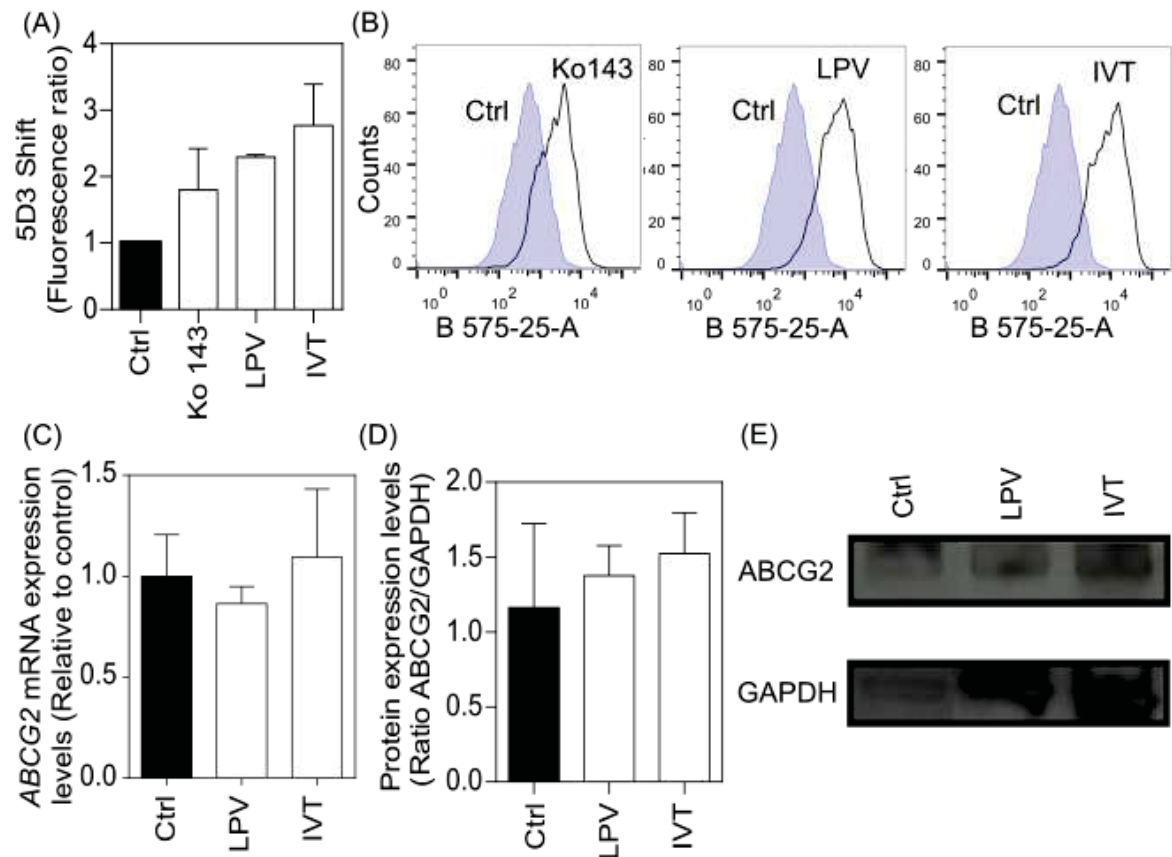


FIGURE 3 - ABCG2 inhibition by flow cytometry. **(A)** Conformational 5D3 antibody binding. The data was normalized by the untreated control. **(B)** Representative histograms of "5D3 shift" assay: Ko143 (1 μ M), lopinavir (100 μ M) and ivermectin (100 μ M) conditions. **(C)** mRNA expression levels quantified by qPCR. **(D)** Protein expression levels quantified by western blot. **(E)** Representative image of western blot assay.

Drugs that inhibit the transport activity of ABC transporters are called functional inhibitors. This inhibition effect is settled on the direct binding of ligands in a druggable binding pocket of these transporters, commonly located at transmembrane domains (KOWAL *et al.*, 2021; ZATTONI *et al.*, 2022a). However, drugs targeting transcriptional or posttranslational protein levels have been described as promising to overcome the MDR phenotype. Drugs that trigger this effect are considered modulators, to differentiate of functional inhibitors. In addition, a dual effect, direct transport inhibition and decreased protein levels is advantageous, but rarely observed (ZATTONI *et al.*, 2022a). Here, the effect of lopinavir and ivermectin on ABCG2 was tested at transcriptional and translational levels, by qPCR and western blot, respectively. Considering a half-life of approximately 60 hours for ABCG2 in different cell lines (IMAI

et al., 2009; PENG *et al.*, 2010), both assays were performed after 72 hours of drug exposure. In addition, to avoid a bias associated with the cytotoxicity effect, the highest drug concentration that does not decrease the cell viability was used. In this case, 6.25 and 1.56 μM for lopinavir and ivermectin, respectively (Fig. 2D and E). As shown in Fig. 3C, lopinavir and ivermectin did not modulate the mRNA expression levels of ABCG2. The western blot results also revealed an absence of effect of both drugs on protein expression levels (Fig. 3D). Together, these data confirm that lopinavir and ivermectin are not modulators of ABCG2 expression levels and should be classified as functional inhibitors of ABCG2.

To get insights into the mechanism of ABCG2 inhibition, the type of inhibition caused by ivermectin and lopinavir was investigated by varying the concentrations of the inhibitor and the substrate mitoxantrone. This ABCG2 substrate was used instead of Hoechst 33342 because only with mitoxantrone a saturation curve was achieved. Both drugs caused a noncompetitive inhibition, since an increase of V_{MAX} with no effect on K_{M} value was observed (Fig. 4). The ABCG2 noncompetitive inhibition was already reported by some compounds, such as stilbene derivatives (VALDAMERI *et al.*, 2012b). Recently, an uncompetitive and mixed-type of inhibition were also described for indenoindole (GURAGOSSIAN *et al.*, 2021) and porphyrins, respectively (ZATTONI *et al.*, 2022b).

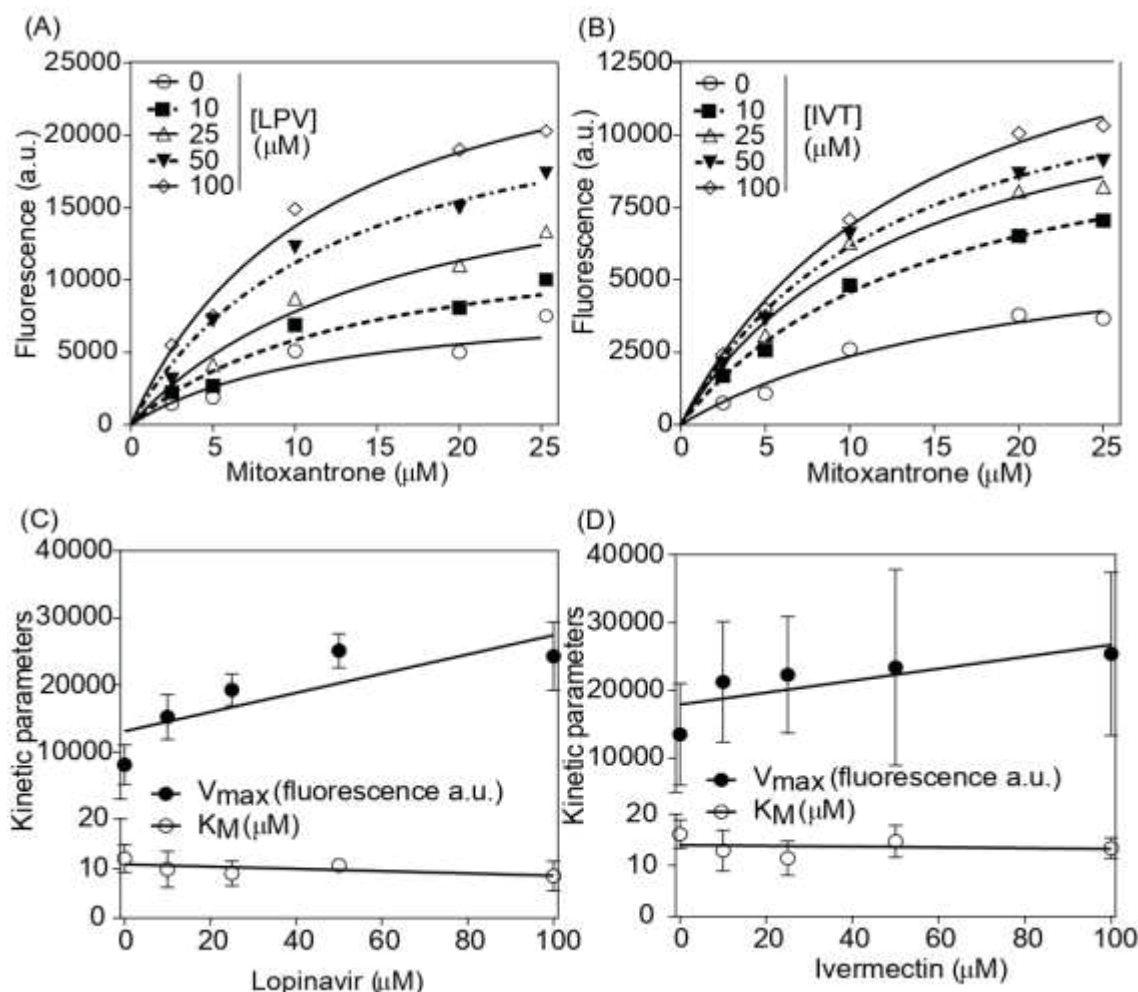


FIGURE 4 - Kinetic behavior of mitoxantrone ABCG2-mediated efflux by flow. Intracellular fluorescence using a range of mitoxantrone/inhibitors concentrations. (A) Lopinavir (LPV). (B) Ivermectin (IVM). Comparison of V_{max} and K_m of (C) lopinavir and (D) ivermectin. Data represents the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments.

3.4 Molecular docking and dynamic simulations

In order to understand the noncompetitive inhibition caused by lopinavir and ivermectin, *in silico* analyses were performed using molecular docking, molecular dynamics and MM/GBSA free binding energy calculations. Initially, molecular docking analysis showed a compatibility of the binding of inhibitors lopinavir and ivermectin in presence of the substrate mitoxantrone, revealing multiple conformations of each ligand co-occupying the drug binding cavity (DBC). The results suggested that the large DBC, located between both subunits of transmembrane helices, is capable of accommodating one molecule of mitoxantrone and one molecule of each inhibitor simultaneously (Fig. 5).

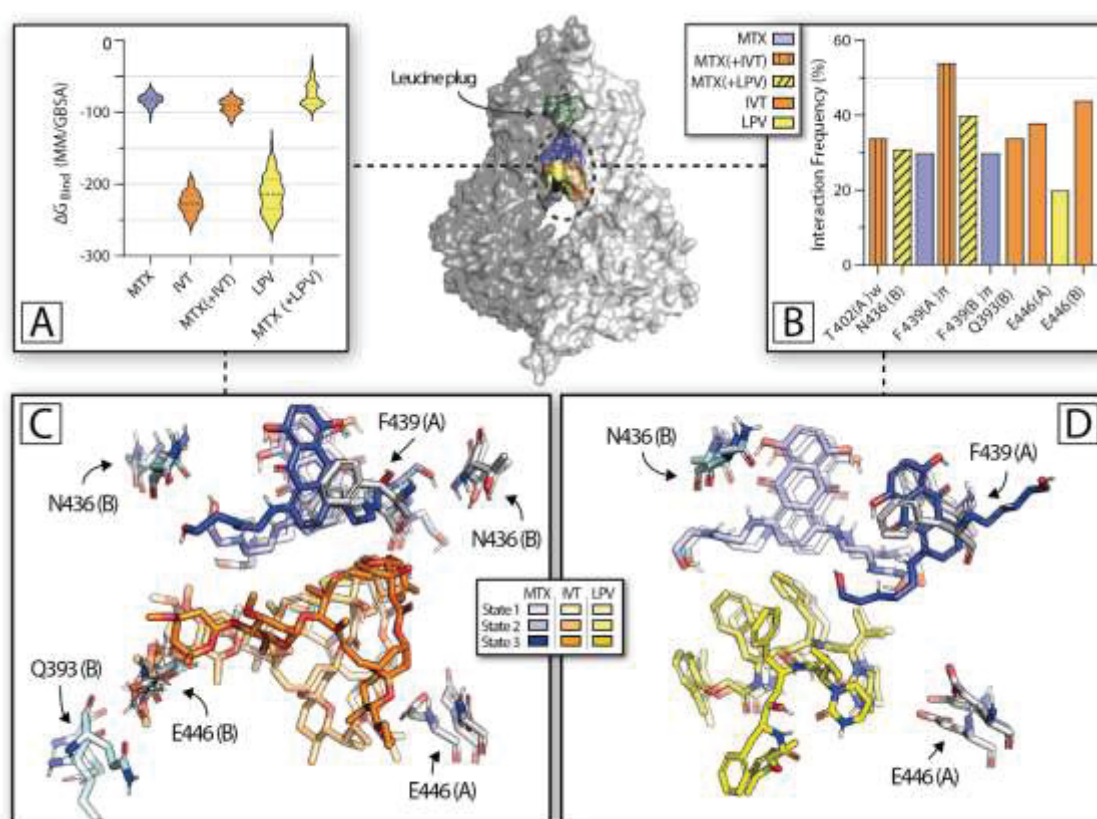


FIGURE 5 - Molecular docking and molecular dynamic simulations. **(A)** Violin plot shows calculated binding affinity (kcal/mol) of MTX and MTX (+ inhibitor) complexes. **(B)** Bar chart, with interaction frequency (fraction of simulation time) between important residues and each molecule. **(C and D)** Sticks representation of three most prevalent populations of IVT (shades of orange), LPV (shades of yellow) and MTX (shades of blue). Residues with frequent interactions are indicated with arrows. Oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue, respectively, and non-polar hydrogens are omitted. In the center: Surface representation of 6VXI and ligands in State 1, indicating the DBC, delimited by the leucine 554/555 plug (colored in pale green). MTX is mitoxantrone; LPV is lopinavir and IVT is ivermectin.

To further investigate the stability of the complex ligands-ABCG2 and specific types of interaction and other potential binding modes, molecular dynamics (MD) simulations were performed. The results were similar from the observed by docking. Analysis of root-mean square deviation (RMSD) values via a clustering algorithm showed three states in proximity for each inhibitor, indicating a low variation in terms of mobility inside the drug binding pocket of ABCG2 (Fig. 5C and D). These data suggest that binding of a second molecule, in this case an inhibitor, cannot displace mitoxantrone from the DBC. In accordance, previous works of MD simulations using cryo-EM obtained structures strongly suggests that ligands can alter the protein conformation, allowing a simultaneous binding of substrates and inhibitors (NAGY *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2021).

Docking results initially showed that the most common interaction between ABCG2 transporter and mitoxantrone involves a π -stacking with F439 (Fig. 5). MD results confirmed this observation and mitoxantrone binding was mainly favored by π -stacking interactions between the anthracenedione core of mitoxantrone and F439, as well by H-bonds with N436 from both subunits. The lack of interactions between mitoxantrone and ivermectin revealed by docking results was further elucidated by MD, that showed a frequent water-mediated H-bonds present between the tetrahydropyran moiety of ivermectin and E446 (Fig. 5B and C). This amino acid residue also interacted with lopinavir, indicating an important role for stabilization of these inhibitors inside the drug pocket in presence of MTX. Together, these results suggest an absence of overlap between inhibitors and mitoxantrone, providing a plausible explanation for the noncompetitive inhibition. While mitoxantrone occupied an “upper” position, closer to the L554/555 plug, IVT and LPV occupied a “below” position, closer of the cytoplasmic side (Fig. 5). Furthermore, mitoxantrone acted similarly in the presence or absence of an inhibitor, basically conserving the high frequency of F439/N436 interactions. The binding free energies (ΔG_{bind}) estimated revealed that the binding of IVT or LPV does not significantly alter the mitoxantrone binding affinity (Fig. 5).

Previous reports suggest that F439 is critical for the binding and stabilization of substrates by “clamping” the molecule inside the cavity (GOSE *et al.*, 2020), and mutations at position 439 severely impairs Hoechst 33342 and Pheophorbide A transport (GOSE *et al.*, 2020). Interestingly, the importance of N436 appears to be more specific and dependent of the molecule (GOSE *et al.*, 2020; KOWAL *et al.*, 2021), being indispensable for mitoxantrone transport (GURAGOSSIAN *et al.*, 2021). The importance of E446 for ABCG2 function was also confirmed by mutagenesis studies (KHUNWEERAPHONG; STOCKNER; KUCHLER, 2017; SZÖLLÖSI; STOCKNER; KUCHLER, 2019). Our data suggest that mitoxantrone binds to the F436 region, while the inhibitors were trapped between E446 residues, blocking the proximity of transmembrane domains needed for the catalytic cycle of transport mediated by ABCG2. This spatial configuration allows these inhibitors to act as a “wedge”, preventing the approach of transmembrane helices necessary to attain turnover conformations that potentially precede substrate efflux to the extracellular space (YU *et al.*, 2021), but not avoiding substrate accommodation inside the DBC. However, a complete comprehension of underlying the catalytic cycle and drug dislocation from

cavity 1 (drug binding pocket) to cavity 2 (above the L555), as well the conformational changes induced by these inhibitors require additional studies.

4. Conclusion

Our results demonstrated that lopinavir and ivermectin are functional inhibitors of ABCG2. Both drugs were not recognized as substrates and did not affect the mRNA and protein expression levels. In addition, lopinavir and ivermectin increased the binding of antibody 5D3, such as the reference inhibitor Ko143. Both compounds caused a noncompetitive inhibition, binding in a different site than mitoxantrone, as also confirmed by molecular dynamics. Thus, the data shows that lopinavir and ivermectin can be used as scaffolds for the design of most powerful ABCG2 inhibitors.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We thank Dr. Attilio Di Pietro from IBCP (France), Dr. Robert W. Robey and Dr. Michael Gottesman from NCI/NIH (USA) for having provided the cell lines. This work was supported by PROIND 2020 (UFPR), Fundação Araucária/PPSUS (grant number 2020131000003) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance code 001). The authors would like to thank the Finnish IT center for science (CSC), Ltd. for the generous computational resources. The study was financially supported by the TüCAD2, a program funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and the Baden-Württemberg Ministry of Science as part of the Excellence Strategy of the German Federal and State Governments (TK). In addition, TK was funded by the Fortüne grant initiative under the Excellence Strategy.

References

- ALLEN, J. D. *et al.* Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. **Molecular cancer therapeutics**, 2002.
- ALLIKMETS, R. *et al.* A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 58, n. 23, p. 5337–5339, 1998.
- BOUMENDJEL, A. *et al.* Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation. **Curr Med Chem**, v. 18, p. 3387–3401, 2011.
- BOWERS, K. J. *et al.* Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. n. November, 2006.
- DARDEN, T. *et al.* Particle mesh Ewald : An Nlog (N) method for Ewald sums in large systems Particle mesh Ewald : An N -log (N) method for Ewald sums in large systems. v. 10089, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**. v. 11, p. 1156-1166, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.GR-1649R>
- DOYLE, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15665–70, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
- EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- GOSE, T. *et al.* ABCG2 requires a single aromatic amino acid to “ clamp ” substrates and inhibitors into the binding pocket. [S. I.], n. December 2019, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201902338RR>
- GOTTESMAN, M. M. MECHANISMS OF CANCER DRUG RESISTANCE. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 615–27, 2002.
- GOTTESMAN, M. M. *et al.* Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. n. October 2015, p. 1–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103111>
- GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- GURAGOSSIAN, N. *et al.* Uncompetitive nanomolar dimeric indenoindole inhibitors of the human breast cancer resistance pump ABCG2. **European journal of medicinal chemistry**, v. 211, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.113017>
- KALETRA: Tablets. USA. AbbVie, 2016. 1 Medicine leaflet.
- HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94*. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, p. 490–519, 1996 a.
- HALGREN, T. A. Extension of MMFF94 Using Experimental Data , Additional Computational Data , and Empirical Rules * Experimental Data Used in. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1996, 1996 b.
- HALGREN, T. A. Molecular Geometries and Vibrational Frequencies for MMFF94 *. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1 1996, p. 553–586, 1996 c.

- HALGREN, T. A. Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions *. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1996, p. 520–552, 1996 d.
- HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 720–729, 1999.
- HALGRENT, T. A.; NACHBAR, R. B. Conformational Energies and Geometries for MMFF94 *. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1996, p. 587–615, 1996.
- HALL, M. D.; HANDLEY, M. D.; GOTTESMAN, M. M. **Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity**. v. 30, n. 10, p. 546-556, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.003>
- IMAI, Y. *et al.* Breast cancer resistance protein/ABCG2 is differentially regulated downstream of extracellular signal-regulated kinase. **Cancer Science**, v. 100, n. 6, p. 1118–1127, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2009.01154.X>
- JACOBSON, M. P. *et al.* A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction. v. 367, n. April 2003, p. 351–367, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.10613>
- JANI, M. *et al.* Ivermectin interacts with human ABCG2. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 1, p. 94–97, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JPS.22262>
- JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. v. 926, n. May 2012, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- JUVALE, K.; WIESE, M. Design of inhibitors of BCRP/ABCG2. **Future medicinal chemistry**, England, v. 7, n. 12, p. 1521–1527, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.15.83>
- KHUNWEERAPHONG, N.; STOCKNER, T.; KUCHLER, K. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. **Scientific Reports**. August, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>
- KITA, D. H. *et al.* Mechanistic basis of breast cancer resistance protein inhibition by new indeno[1,2-b]indoles. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79892-w>
- KOWAL, J. *et al.* Structural Basis of Drug Recognition by the Multidrug Transporter ABCG2. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 13, p. 1–48, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166980>
- LU, C. *et al.* OPLS4 : Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00302>
- MIYAKE, K. *et al.* Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-resistant Cells. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 1999.
- MIYATA, H. *et al.* Identification of febuxostat as a new strong ABCG2 inhibitor: Potential applications and risks in clinical situations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. DEC, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00518>
- MORRIS, G. M. *et al.* Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4 : Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc>
- NAGY, T. *et al.* The transport pathway in the ABCG2 protein and its regulation revealed by molecular dynamics simulations. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03651-3>
- ORLANDO, B. J.; LIAO, M. ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. **Nature Communications**, n. 2020, p. 1–11. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16155-2>

- PENG, H. *et al.* Dynamic vs Static ABCG2 Inhibitors to Sensitize Drug Resistant Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 15276, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015276>
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>
- RABINDRAN, S. K. *et al.* Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. **Cancer Research**, 1998.
- ROBEY, R. W. *et al.* **Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer**. v. 18, n. 7, p. 452-464. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
- SHIM, J. S.; LIU, J. O. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 654, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/IJBS.9224>
- STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. **J. Chem. Inf. Model**, p. 1–4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>
- STEWART, J. J. P.; CHEMISTRY, S. C. **MOPAC2016**. [s. l.], 2016.
- STROMEKTOL: Tablets. USA. Merck, 2009. 1 Medicine leaflet.
- SZAKACS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1984>
- SZAKÁCS, G. *et al.* **Targeting the achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance**. v. 11, n. 11, p. 5753-577. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr4006236>
- SZÖLLÖSI, N. K. D.; STOCKNER, T.; KUCHLER, K. The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid. **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 10, n. 5433, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13302-2>
- TAMAKI, A. *et al.* The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays Biochem**, v. 50, n. 1, p. 209–232, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bse0500209>
- TAYLOR, N. M. I. *et al.* Structure of the human multidrug transporter ABCG2. **Nature**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- TELBISZ, Á. *et al.* Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.021>
- TELBISZ, Á. *et al.* Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13010081>
- TOYODA, Y.; TAKADA, T.; SUZUKI, H. Inhibitors of Human ABCG2 : From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. **Front. Pharmacol.**, v. 10, n. March, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00208>
- VALDAMERI, G. *et al.* Investigation of Chalcones as Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein: Critical Role of Methoxylation in both Inhibition Potency and Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 3193–3200, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm2016528>
- VALDAMERI, G. *et al.* Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 322–330, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb200435y>

- VALDAMERI, G. *et al.* Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 966–970, 2012 c.
- VESGA, L. C. *et al.* Tetrahydroquinoline/4,5-Dihydroisoxazole Molecular Hybrids as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). **ChemMedChem**, v. 16, n. 17, p. 2686–2694, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100188>
- WEISS, J. *et al.* Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 238–245, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL474>
- WEISS, J.; BAJRAKTARI-SYLEJMANI, G.; HAEFELI, W. E. Interaction of Hydroxychloroquine with Pharmacokinetically Important Drug Transporters. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12100919>
- YU, Q. *et al.* Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism. **Nature Communications**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24651-2>
- ZATTONI, I. F. *et al.* Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 237, n. November 2021, 2022 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114346>
- ZATTONI, I. F. *et al.* A new porphyrin as selective substrate-based inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, n. August 2021, 2022 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109718>
- ZATTONI, I. F. *et al.* Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 237, p. 114346, 2022 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2022.114346>

CAPÍTULO 3

Este capítulo consiste em um projeto de elaboração de um novo sistema de *drug delivery* baseado em vesículas extracelulares (VEs) de células sanguíneas e do plasma. As VEs humanas possibilitam a entrega de drogas, com baixa solubilidade em água, que seriam inviáveis em formulações farmacêuticas convencionais, além de ampliar a possibilidade de ensaios clínicos com estas drogas. Nesse trabalho, o uso de VEs obtidas a partir de células sanguíneas e do plasma foi caracterizado para incorporar e promover a entrega de drogas (*drug delivery*) hidrofóbicas, como inibidores de transportadores ABCG2 e P-gp. A patente a seguir foi submetida recentemente para a Agência da Inovação da UFPR e os documentos de Resumo, Reivindicações, Relatório Descritivo, Figura e Formulários enviados estão a seguir.

RESUMO

VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO COMO VEÍCULOS DE ENTREGA DE DROGAS HIDROFÓBICAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

A formulação farmacêutica é um dos aspectos críticos no desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente para compostos hidrofóbicos, como os inibidores de transportadores ABC. Os transportadores ABC, como ABCG2 e glicoproteína P (P-gp), são proteínas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas em pacientes oncológicos. Vários inibidores de transportadores ABC já foram descritos na literatura, apresentando excelentes resultados de inibição. Contudo, suas características físico-químicas são incompatíveis com uma formulação convencional, fato atribuído principalmente à sua insolubilidade em água. Outro inconveniente das formulações farmacêuticas convencionais para fármacos hidrofóbicos são os efeitos adversos, inerente às características químicas dos compostos utilizados para solubilizar o fármaco. Considerando esse contexto, propomos um sistema de entrega de drogas (*drug delivery*) baseado no uso de vesículas extracelulares (VEs) derivadas de células sanguíneas humanas e plasma humano. Essa abordagem permitiu a incorporação de compostos hidrofóbicos em uma formulação totalmente compatível com o paciente, haja vista que tal formulação pode ser preparada a partir de células/plasma do próprio receptor. A prova de conceito foi realizada utilizando dois inibidores hidrofóbicos de transportadores ABC, a cromona 4a, um inibidor de ABCG2 e o elacridar, um inibidor de P-gp. Ambos os inibidores foram incorporados nas VEs e liberados no interior das células que superexpressam os transportadores ABC, sendo efetivamente capazes de inibirem o transporte *in vitro* de substratos fluorescentes dos transportadores, conforme avaliado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram, pela primeira vez, a promissora utilização de VEs do sangue para sistemas de entrega de drogas hidrofóbicas tendo como alvo proteínas de membrana, o que demonstra potencial de aplicação clínica de reversão de MDR em câncer.

REIVINDICAÇÕES

VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO COMO VEÍCULOS DE ENTREGA DE DROGAS HIDROFÓBICAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

- 1) Uso de vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano,** caracterizadas por incorporar e promover a entrega de drogas (*drug delivery*) hidrofóbicas, como inibidores de transportadores ABC.

RELATÓRIO DESCRITIVO

VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO COMO VEÍCULOS DE ENTREGA DE DROGAS HIDROFÓBICAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito ao uso de vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células sanguíneas e plasma humano como veículos para a entrega de drogas (*drug delivery*), a fim de possibilitar o uso pré-clínico e clínico de compostos com relevante atividade biológica *in vitro*, porém, com característica físico-química de baixa solubilidade em água.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002] Vários novos candidatos a fármacos são compostos altamente lipofílicos. As drogas hidrofóbicas possuem vários problemas de entrega, incluindo limitada biodisponibilidade após a ingestão oral, menor capacidade de difusão na membrana externa e exigem mais quantidade para administração intravenosa (PATRA *et al.*, 2018). Consequente, seu efeito terapêutico é dependente da sua solubilidade em água. Assim, esse parâmetro é de grande importância para a liberação do fármaco no ambiente aquoso da circulação sanguínea para, então, atingir seu alvo. Em formulações farmacêuticas sólidas orais, por exemplo, a incorporação de fármacos não solúveis em água torna-se complexa, pois podem ser menos absorvidos após a administração oral, e ainda, podem sofrer efeitos na sua passagem pelo trato gastrointestinal (muito variável neste tipo de formulação). Na formulação farmacêutica para administração intravenosa, fármacos hidrofóbicos são um grande desafio. A utilização de solventes orgânicos, nos quais os ensaios *in vitro* são realizados, não pode ser clinicamente empregada devido à sua toxicidade (MORENO-CAMACHO; MONTROYA-TORRES; JAEGLER, 2019). Surfactantes são frequentemente utilizados para aumentar a solubilização de fármacos lipofílicos. Por exemplo, Cremophor, feito pela reação de óxido de etileno com óleo de rícino, tem sido utilizado para solubilizar fármacos hidrofóbicos como anestésicos, analgésicos, imunossuppressores e antineoplásicos, paclitaxel (Taxol) (STRAUB *et al.*, 2005). Outro surfactante muito utilizado é o Tween 80 ou polissorbato 80 para solubilização de amiodarona, vitamina K, etoposídeo e docetaxel (SCHWARTZBERG, 2018).

Entretanto, tanto Cremophor quanto Tween 80 são veículos inertes e os efeitos colaterais, como reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade foram atribuídos a esses surfactantes (GELDERBLOM *et al.*, 2001; SCHWARTZBERG, 2018). Por isso, torna-se cada vez mais necessária a criação de sistemas de *drug delivery* em formulações farmacêuticas compatíveis com fármacos hidrofóbicos, que possam incorporar essas moléculas e distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em ambientes aquosos, para obtenção do fim terapêutico desejado enquanto reduz efeitos adversos (STREUBEL; SIEPMANN; BODMEIER, 2006; VIPPAGUNTA *et al.*, 2007; ZHAI *et al.*, 2020)

[003] O câncer ocupa a segunda posição entre as doenças com maior mortalidade mundial. Em 2018 estimou-se que ocorreriam mais de 18 milhões de mortes no mundo em decorrência dessa doença. Para os anos 2020 a 2022, estima-se que ocorrerão 625 mil novos casos anuais de câncer no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente, seguido de mama e próstata (ESTIMATIVA 2020 : INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL, 2019). Esse quadro é ainda agravado pela ocorrência de resistência a múltiplas drogas, cujo principal mecanismo é a superexpressão de transportadores ABC (LIU; PAN, [s. d.]). Dessa forma, a identificação de inibidores dos transportadores ABC (*ATP binding cassette*) é de grande interesse para a melhoria e assertividade de terapias para tratamento do câncer. Glicoproteína P (P-gp) e ABCG2 são proteínas transmembranas amplamente reconhecidas como mediadores do efluxo de diversos quimioterápicos, diminuindo assim sua concentração intracelular e, conseqüentemente, levando à falha da quimioterapia. Por isso, é de extrema importância à busca de agentes de reversão eficazes para superar a MDR mediada por transportadores ABC. Como exemplo, podemos citar os derivados de cromonas: MBL-II-141 (cromona 6g) e cromona 4a (HONORAT *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2016; VALDAMERI *et al.*, 2012d). Ambos os compostos inibem especificamente o transportador ABCG2, apresentando uma atividade inibitória superior ao inibidor referência deste transportador, o composto chamado de Ko143. Além dos resultados promissores de inibição observados *in vitro*, o uso do MBL-II-141 foi validado *in vivo* (HONORAT *et al.*, 2014). Entretanto, a aplicação clínica desses compostos que são hidrofóbicos é restringida pela falta de um veículo eficiente que permita a sua solubilidade em ambientes aquosos sem efeitos colaterais (MORENO-CAMACHO; MONTOYA-TORRES; JAEGLER, 2019).

Assim, torna-se urgente a descoberta de um sistema de *drug delivery* compatível com essa classe química de inibidores (PIRES *et al.*, 2016).

[004] As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas carreadoras naturais e assim passaram a ser estudadas como novo arcabouço para *drug delivery*, com a vantagem de serem totalmente biocompatíveis, por serem de origem biológica (AGRAHARI *et al.*, 2018). VEs podem variar de acordo com a célula de origem, tamanho, morfologia e conteúdo de carga. E podem ser classificadas em dois grupos: exossomos e microvesículas (NIEL; ANGELO; RAPOSO, 2018). Quando liberadas através do brotamento externo da membrana plasmática das células de origem, são denominadas de microvesículas e podem variar em seu tamanho de 50 nm a 1 µm. Quando ocorre a formação de brotamentos internos da membrana endossomal ocorre a formação de corpos multivesiculados (MVBs), que são liberados pela fusão da membrana externa do MVB à membrana plasmática. Estes são chamados de exossomos e podem apresentar tamanho variando de 30 a 150 nm (ABELS; BREAKFIELD; HOSPITAL, 2017).

[005] Fisiologicamente, VEs desempenham um papel importante na comunicação intercelular através da transferência de carga biológica. As VEs podem exercer seus efeitos em processos biológicos fundamentais de maneira pleiotrópica, ativando diretamente os receptores de superfície celular por meio de proteínas e ligantes lipídicos bioativos, fundindo seu conteúdo de membrana na membrana plasmática de células receptoras e entregando efetores, incluindo proteínas, fatores de transcrição, lipídios e fosfolipídios, RNAs reguladores não codificantes como microRNAs (miRNAs), mRNAs e partículas infecciosas (ABELS; BREAKFIELD; HOSPITAL, 2017; ANDALOUSSI, SAMIR E L; MÄGER, IMRE; BREAKFIELD; WOOD, 2013; ANDALOUSSI *et al.*, 2013; CAMUSSI *et al.*, 2011; RAFA; URBANOWICZ; BRAN, 2006; RATAJCZAK *et al.*, 2006; VALADI *et al.*, 2007b). A comunicação entre células é de grande importância para todos os organismos multicelulares. Essa troca de informações não está limitada a secreção de fatores solúveis ou interação direta em processos celulares normais, mas pode ocorrer em processos patológicos (BUZAS *et al.*, 2015; CICERO; STAHL, 2015; COLOMBO, 2014; DEATHERAGE; COOKSON, 2012; JOHNSTONE *et al.*, 1987; NIEL; ANGELO; RAPOSO, 2018; ROBINSON; DING; JIANG, 2016; SCHOREY *et al.*, 2015). Adicionalmente, o processo de vesiculação pode ser induzido. Esse processo não está completamente esclarecido, entretanto, estudos indicam que a elevação na

concentração de cálcio citoplasmático associado ao deslocamento do equilíbrio na simetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática desempenham papel fundamental nesse processo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013b). A elevação do íon Ca^{2+} promove ativação das enzimas escramblase, calpaína e gelsolina, a primeira desempenhando papel no transporte de fosfolipídeos e as duas últimas relacionadas com alterações no citoesqueleto e clivagem de filamentos de actina. Concomitante a esses processos, ocorre inativação de translocases que mantém os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina voltados para a camada interna (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009). Esse processo leva a formação de vesículas estruturalmente caracterizadas por uma bicamada lipídica constituída por esfingomiélin, fosfatidilserina e outros fosfolipídios. Intercalados com esses fosfolipídeos temos proteínas de membrana, de adesão e colesterol (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013b).

[006] Cientificamente, VEs tem ganhado atenção desde a descoberta de que elas transferem mRNAs e microRNAs (miRNAs) do doador para as células receptoras induzindo alterações funcionais (VALADI *et al.*, 2007b). Além do conteúdo ou carga fisiológica, VEs, sobretudo exossomos, tem sido explorados como veículo de entrega de ácidos nucléicos exógenos e pequenas moléculas (JONG *et al.*, 2019). Por exemplo, doxorrubicina, paclitaxel e curcumina foram incorporadas em exossomos liberados de células em cultura para tratar resistência em câncer e doenças inflamatórias em animais (TIAN *et al.*, 2014)(KIMA *et al.*, 2016)(SUN *et al.*, 2010). A incorporação de paclitaxel pelas células tumorais foi mais eficiente quando carregado por exossomos do que por lipossomas sintéticos. Em células multirresistentes, devido a expressão de P-gp, a toxicidade do paclitaxel também foi aumentada significativamente pelo aumento de incorporação da droga (KIMA *et al.*, 2016). De maneira análoga, o carregamento de celastrol por exossomos, uma droga de baixa solubilidade/permeabilidade, também foi benéfico para promoção de efeito antiproliferativo em células de câncer de pulmão (AQIL *et al.*, 2016). Existem, pelo menos, três exemplos na literatura da utilização de VEs em ensaios de fase clínica I. Antígenos associados a melanoma (MAGE) foram incorporados em exossomos autólogos liberados de células dendríticas em pacientes com câncer de pulmão (MORSE *et al.*, 2005) e melanoma(ESCUDIER *et al.*, 2005), como estratégia de imunoterapia para eliciar resposta imune. A imunoterapia de pacientes com câncer de colorretal usando exossomos derivados de ascite autóloga com GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) foi eficiente na indução de

imunidade antitumoral sistêmica específica de tumor (WOLFERS *et al.*, 2001). Os resultados foram promissores, com baixa toxicidade e resposta inflamatória branda. A grande vantagem no uso de VEs é a sua baixa imunogenicidade, biocompatibilidade e estabilidade em plasma. Ao atingir as células receptoras, as VEs liberam seus conteúdos sem entrarem nas vias de degradação celular (RUFINO-RAMOS *et al.*, 2017; TURTURICI *et al.*, 2022). Outra vantagem apresentada pelas VEs é a sua capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011; ANDALOUSSI *et al.*, 2013; RUFINO-RAMOS *et al.*, 2017).

[007] As VEs estão presentes em diversos tecidos e fluidos (plasma/soro, urina, leite materno, sêmen, líquido amniótico, saliva, ascite), e uma das fontes mais estudadas é o sangue (AGRAHARI *et al.*, 2018; CABY *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2007; KIM; LEE; GHO, 2017; LEISS *et al.*, 2008; UTLEG *et al.*, 2003; YONG *et al.*, 2019). Além das VEs secretadas pelas células sanguíneas, VEs de diversas origens estão presentes na corrente sanguínea, as VEs circulantes, a citar: hepatócitos, células dendríticas ou até mesmo as células sanguíneas (ALBERRO; IPARRAGUIRRE; FERNANDES, 2021; MORELLI *et al.*, 2004; THIETART; RAUTOU, 2020). VEs circulantes são relativamente fáceis de obter com amostras minimamente invasivas. Essas VEs são, portanto, constituintes endógenos. Exemplos de estudos *in vitro* e *in vivo* de exossomos de soro de camundongo projetados para entregarem drogas como dopamina e de soro humano comercial projetados para entregarem peptídeo terapêutico BAY55-9837 estão disponíveis (QU *et al.*, 2018b; ZHUANG *et al.*, 2019). Pelo nosso conhecimento, Zhuang e cols (2019) utilizaram soro humano comercial para isolamento dos exossomos, enquanto todos os outros trabalhos utilizaram amostra de sangue de animais. Nesse caso, o peptídeo polar BAY55-9837 foi incorporado aos exossomos que ainda foram funcionalizados para ter como alvo as ilhotas pancreáticas de camundongos a fim de aumentar a secreção de insulina.

[008] Várias evidências na literatura sugerem que VEs produzidas por células sanguíneas, tanto eritrócitos (glóbulos vermelhos), quanto monócitos, granulócitos e plaquetas, podem ser utilizadas como sistema de liberação de drogas (CHIANGJONG; NETSIRISAWAN; HONGENG, 2021). Entretanto, as fontes celulares atuais para a produção de VEs são limitadas em disponibilidade e segurança em termos de transferência horizontal de genes. Nesse sentido, as VEs de eritrócitos teriam uma vantagem por serem desprovidos de DNA e por estarem prontamente disponíveis em bancos de sangue (CHIANGJONG; NETSIRISAWAN; HONGENG,

2021; USMAN *et al.*, 2018). Eritrócitos podem ser separados das células sanguíneas brancas e plasma por centrifugação e leucodepleção a partir do sangue total para que, então, o processo de vesiculação possa ser induzido para obtenção das VEs de eritrócitos (USMAN *et al.*, 2018). Os estudos com VEs de eritrócitos humanos tinham como foco a liberação de RNA (USMAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020). Adicionalmente, os exemplos de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizaram VEs de eritrócitos de camundongos para a liberação de compostos hidrofílicos como PLGA - poli(ácido láctico-co-glicólico), doxorrubicina e vancomicina e para liberação de um fármaco hidrofóbico como camptotecina (HU *et al.*, 2011; MALHOTRA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017).

[009] Apesar da capacidade de diversos compostos inibirem efetivamente os transportadores ABCG2 e P-gp, sua propriedade físico-química de baixa solubilidade em água dificultaria o desenvolvimento de um medicamento bem-sucedido. Entretanto, a aplicação de um sistema de nanopartículas baseado em VEs poderia superar essa limitação, com comprovada baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[010] Os transportadores ABC representam a principal causa de resistência a quimioterapia em câncer. Tais transportadores são capazes de expulsar o agente quimioterápico do meio intracelular, assim, o medicamento permanece em doses subterapêuticas. Nesse contexto, o desenvolvimento de inibidores dos transportadores ABC é uma estratégia promissora para o tratamento do câncer (ZATTONI *et al.*, 2022). Um dos problemas no desenvolvimento de inibidores de transportadores ABC para uso clínico é sua insolubilidade em água, necessitando obrigatoriamente de um sistema de *drug delivery* que possibilite sua administração *in vivo* e clínica.

[011] Nosso grupo de pesquisa identificou diferentes classes de compostos como potenciais inibidores dos transportadores ABC. Estes inibidores mostraram-se promissores em relação a sua atividade biológica, porém, algumas classes apresentam limitações físico-químicas importantes que dificultam a sua avaliação em modelos pré-clínicos. Para suplantar as limitações apresentadas pelos compostos, testes preliminares foram conduzidos pelo grupo usando vesículas extracelulares produzidas por *Giardia intestinalis* (dados não publicados). Os resultados foram promissores, haja vista que as VEs de giardia incorporaram e

carrearam com sucesso os inibidores testados. A limitação deste modelo biológico é a incompatibilidade das vesículas com testes clínicos em humanos. Assim, investimos em usar VEs presentes no plasma e a partir da estimulação de células sanguíneas humanas para gerar um sistema de *drug delivery* com 100% de biocompatibilidade com o receptor. Para evitar transferência gênica horizontal ou reações de incompatibilidade doador-receptor, as VEs poderiam ser produzidas com células do sangue do próprio paciente (autóloga). As VEs foram obtidas por duas estratégias: (1) obtidas diretamente do plasma sanguíneo e (2) através de um estímulo de vesiculação de células sanguíneas com cálcio.

[012] Para avaliar a eficácia das VEs obtidas de células sanguíneas humanas para sistema de *drug delivery* de inibidores de transportadores ABC, realizamos ensaios de inibição *in vitro* usando linhagens celulares que superexpressam os transportadores ABCG2 e P-gp. Os inibidores utilizados foram a cromona 4a e o elacridar (GF120918). A Cromona 4a é um potente inibidor seletivo de ABCG2, enquanto o elacridar é um inibidor duplo, pois inibe ABCG2 e P-gp (BRUIN *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2016). Ambos os inibidores de classes químicas diferentes apresentam baixa solubilidade em água, dificultando seu uso em testes clínicos (PIRES *et al.*, 2016). Após incorporação de ambos os inibidores em VEs de células sanguíneas humanas, foi verificada a capacidade de inibição do transporte de substratos mediado pelos transportadores ABCG2 e P-gp. Adicionalmente, o mesmo efeito foi observado utilizando VEs obtidas diretamente de plasma humano.

[013] Essa estratégia é inovadora e até a presente data nunca foi utilizada para a entrega de inibidores de transportadores ABC. A literatura aponta a promissora utilização de VEs em sistemas de *drug delivery*, principalmente devido à sua alta capacidade de captação de compostos e baixa toxicidade. Entretanto, há dados insuficientes para concluir a eficácia de VEs de plasma e células sanguíneas humanas na entrega de compostos hidrofóbicos com potencial terapêutico *in vitro*, especialmente quando o alvo envolve proteínas de membrana. Por isso, acreditamos que esse método de *drug delivery* também pode ser expandido para o resgate de compostos com excelente atividade biológica, mas que não foram testados em modelos pré-clínicos e clínicos devido às limitações de solubilidade ou estabilidade em água.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[014] O projeto de avaliação do uso VEs de plasma e células sanguíneas humanas como um novo sistema de *drug delivery* para formulação farmacêutica foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do setor de ciências da saúde da Universidade Federal do Paraná - SCS/UFPR sob CAAE 51428521.2.0000.0102. Para o preparo das VEs foram coletados 9 mL de sangue em tubo contendo EGTA 8 mM (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 425 x g por 10 minutos a fim de separarmos o plasma das células sanguíneas. O plasma foi armazenado em um tubo falcon de 15 mL (aproximadamente 4 mL), enquanto as células foram adicionalmente processadas. Foi adicionado nas células meio RPMI (mesma quantidade de volume, aproximadamente 5 mL) e novamente o material foi centrifugado em 425 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensionado com 5 mL de meio RPMI contendo 2 mM de CaCl_2 . As células foram incubadas por uma hora a 37°C com CaCl_2 para produção de VEs, antes de centrifugar novamente a 425 x g por 10 minutos. Aliquotas de 1 mL de plasma (obtido anteriormente) e o sobrenadante obtido após a última centrifugação foram transferidos para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL. Esse material foi centrifugado a 4000 x g por 30 minutos a 10°C, transferindo novamente o sobrenadante dessa etapa para novos tubos de 1,5 mL que foram submetidos a última etapa de centrifugação a 11000 x g por 120 minutos a 10 °C. Nessa última etapa foi descartado o sobrenadante e o pellet contendo as VEs foi solubilizado em 60 µL de PBS.

[015] A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, que determina a quantidade de proteínas totais pela interação com o corante de Coomassie *brilliant blue* G250 (BRADFORD, 1976). A absorbância máxima da solução ácida do corante muda de 495 nm para 595 nm quando ocorre a ligação com proteínas. Foi utilizada uma curva padrão variando a concentração de albumina de soro bovino (BSA) de 0 a 30 µg/mL. Os valores de absorbâncias foram obtidos através de um leitor de microplaca (Bio-Rad – iMark). A concentração da amostra foi determinada através da curva padrão.

[016] Para os ensaios de inibição, 10 µL (proveniente do pellet suspenso em 60 µL de pBS) de VEs obtidas de células sanguíneas e do plasma foram diluídos com PBS para um volume final de 200 µL. As vesículas foram incubadas com o inibidor (cromona 4a ou elacridar) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido

por centrifugação a 11000 x g por 120 minutos a 10°C. O pellet de VEs contendo o inibidor incorporado foi ressuspensionado em 50 µL de PBS. As VEs contendo os inibidores (50 µL) foram utilizadas para o tratamento das células HEK293-ABCG2 e NIH3T3-Pgp (suspensão de 1×10^5 células em 250 µL de meio DMEM alta glucose), concomitantemente com os respectivos substratos de cada transportador (rodamina 123 para P-gp e hoechst 33342 para ABCG2), por 45 minutos a 37°C. Um controle positivo (inibidor não incorporado as VEs) também foi testado. Em paralelo, as células também foram tratadas com o sobrenadante contendo o inibidor (aproximadamente 200 µL). Após tratamento, as células foram centrifugadas a 425 x g por 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 300 µL de PBS para leitura da fluorescência em citometria de fluxo (FACS Celesta). Os dados foram analisados pelos programas FlowJo version X e Graphpad Prism version 6.01.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017] A FIGURA 1 representa os gráficos em barra das porcentagens de inibição do efluxo de substratos mediado pelos transportadores ABCG2 e P-gp. A inibição apresentada foi produzida pelos inibidores incorporados às VEs ou pelo sobrenadante obtido após etapa de centrifugação. (A) Inibição do transportador ABCG2 usando a cromona 4a incorporada nas VEs de células sanguíneas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µM. Também foi avaliada a inibição promovida pelo sobrenadante. (B) Inibição do transportador ABCG2 usando a cromona 4a incorporada em VEs do plasma nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µM. Também foi avaliada a inibição promovida pelo sobrenadante. (C) Inibição do transportador P-gp usando o elacridar incorporado em VEs de células sanguíneas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µM. Também foi avaliada a inibição promovida pelo sobrenadante. (D) Inibição do transportador P-gp usando o elacridar incorporado em VEs do plasma nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µM. Também foi avaliada a inibição promovida pelo sobrenadante. A condição controle (Ctrl) corresponde aos inibidores de referência (Ko143 para ABCG2 e elacridar para P-gp).

REFERÊNCIAS

- ABELS, Erik R.; BREAKEFIELD, Xandra O.; HOSPITAL, Massachusetts General. **HHS Public Access**. v. 36, n. 3, p. 301–312, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>. Introduction
- AGRAHARI, Vivek *et al.* Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 707–729, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.012>
- ALBERRO, Ainhoa; IPARRAGUIRRE, Leire; FERNANDES, Adelaide. Extracellular Vesicles in Blood : Sources , Effects , and Applications. **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22158163>
- ALVAREZ-ERVITI, Lydia *et al.* letters Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- ANDALOUSSI, SAMIR E L; MÄGER, IMRE; BREAKEFIELD; WOOD, Matthew A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Publishing Group**, v. 12, p. 347–357, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- ANDALOUSSI, Samir E. L. *et al.* Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 3, p. 391–397, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.008>
- AQIL, Farrukh *et al.* Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 101, n. 1, p. 12–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.05.013>
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**. v. 254, p. 248–254, 1976.
- BRUIN, Michiel De *et al.* Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. **Cancer Lett**. v. 146, p. 117–126, 1999.
- BUZAS, Edit I. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles**. v. 1, p. 1–60, 2015.
- CABY, Marie-pierre *et al.* Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **Int Immunol**. v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- CAMUSSI, Giovanni *et al.* reprogramming of cells. v. 1, n. 1, p. 98–110, 2011.
- CHIANGJONG, Wararat; NETSIRISAWAN, Pukkavadee; HONGENG, Suradej. Red Blood Cell Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery : Challenges and Opportunities. **Front Med (Lausanne)**. v. 8. December, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.761362>
- CICERO, Alessandra Lo; STAHL, Philip D. ScienceDirect Extracellular vesicles shuffling intercellular messages : for good or for bad. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 35, p. 69-77, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.013>
- COCUCCI, Emanuele; RACCHETTI, Gabriella; MELDOLESI, Jacopo. Shedding microvesicles : artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, n. January, p. 43–51, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- COLOMBO, Marina. Biogenesis , Secretion , and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol**. p. 255–292, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- DEATHERAGE, Brooke L.; COOKSON, Brad T. Membrane Vesicle Release in

- Bacteria , Eukaryotes , and Archaea : a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. **Infect Immun.** v. 80, n. 6, p. 1948–1957, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>
- ESCUDIER, Bernard *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes : results of the first phase I clinical trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1–13, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10>
- Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
- GELDERBLOM, H. *et al.* Cremophor EL : the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **Eur J Cancer.** v. 37, p. 1590–1598, 2001.
- HONORAT, Mylène *et al.* MBL-II-141 , a chromone derivative , enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts. **Oncotarget.** v. 5, n. 23, 2014.
- HU, Che-ming J. *et al.* Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. **Biological Sciences.** v. 108, n. 27, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106634108>
- JOHNSTONE, Rose M. *et al.* Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. **J Biol Chem.** v. 262, n. M, p. 9412–9420, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7)
- JONG, Olivier G. de *et al.* Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. **Acc. Chem. Res.**, v. 52, p. 1761–1770, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00109>
- KELLER, S. *et al.* CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney International**, v. 72, n. 9, p. 1095–1102, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>
- KIM, Oh Youn; LEE, Jaewook; GHO, Yong Song. Extracellular vesicle mimetics: Novel alternatives to extracellular vesicle-based theranostics, drug delivery, and vaccines. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 67, p. 74–82, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.12.001>
- KIMA, Myung Soo *et al.* Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 655–664, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- LEISS, Michael *et al.* The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. p. 502–507, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.001>
- LIU, Xiaodong; PAN, Guoyu. **Drug Transporters in Drug Disposition , Effects and Toxicity.** 2019. *E-book*.
- MALHOTRA, Sahil *et al.* Red Blood Cells-Derived Vesicles for Delivery of Lipophilic Drug Camptothecin. v. 11, n. 25, p. 22141-22151, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04827>
- MORELLI, Adrian E. *et al.* Endocytosis , intracellular sorting , and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3257–3266, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
- MORENO-CAMACHO, Carlos A.; MONTOYA-TORRES, Jairo R.; JAEGLER, Anicia. Sustainability metrics for real case applications of the supply chain network design problem : A systematic literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 231, p. 600–618, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.278>
- MORSE, Michael A. *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients

with advanced non-small cell lung cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1–8, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-9>

NIEL, Guillaume Van; ANGELO, Gisela D.; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Publishing Group**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems : recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

PIRES, Amanda do Rocio Andrade *et al.* New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 291–301, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.053>

QU, Mengke *et al.* Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson ' s disease. **J Control Release**. v. 287, n. June, p. 156–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.035>

RAFA, Monika Baj-krzyworzeka *Æ.*; URBANOWICZ, Barbara; BRAN, *Æ.* Piotr. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. **Cancer Immunol Immunother**. v. 55, n.7, p. 808–818, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0075-9>

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles : Exosomes , microvesicles , and friends. **J Cell Biol**. v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

RATAJCZAK, J. *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors : evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**. v. 20, p. 847–856, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>

ROBINSON, David G.; DING, Yu; JIANG, Liwen. Unconventional protein secretion in plants : a critical assessment. **Protoplasma**. v. 253, n.1 p. 31–43, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0887-1>

RUFINO-RAMOS, David *et al.* Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. **Journal of Controlled Release**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.001>

SCHOREY, Jeffrey S. *et al.* Exosomes and other extracellular vesicles in host – pathogen interactions. **EMBO Rep**. v. 16, n. 1, p. 24–43, 2015.

SCHWARTZBERG, Lee S. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. **Advances in Therapy**, v. 35, n. 6, p. 754–767, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>

STRAUB, Julie A. *et al.* Intravenous Hydrophobic Drug Delivery : A Porous Particle Formulation of Paclitaxel (AI-850). **Pharmaceutical Research**. v. 22, n. 3, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-004-1871-1>

STREUBEL, Alexander; SIEPMANN, Juergen; BODMEIER, Roland. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. **Curr Opin Pharmacol**. v. 6, n. 5, p. 501–508, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.007>

SUN, Dongmei *et al.* A Novel Nanoparticle Drug Delivery System : The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 9, p. 1606–1614, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>

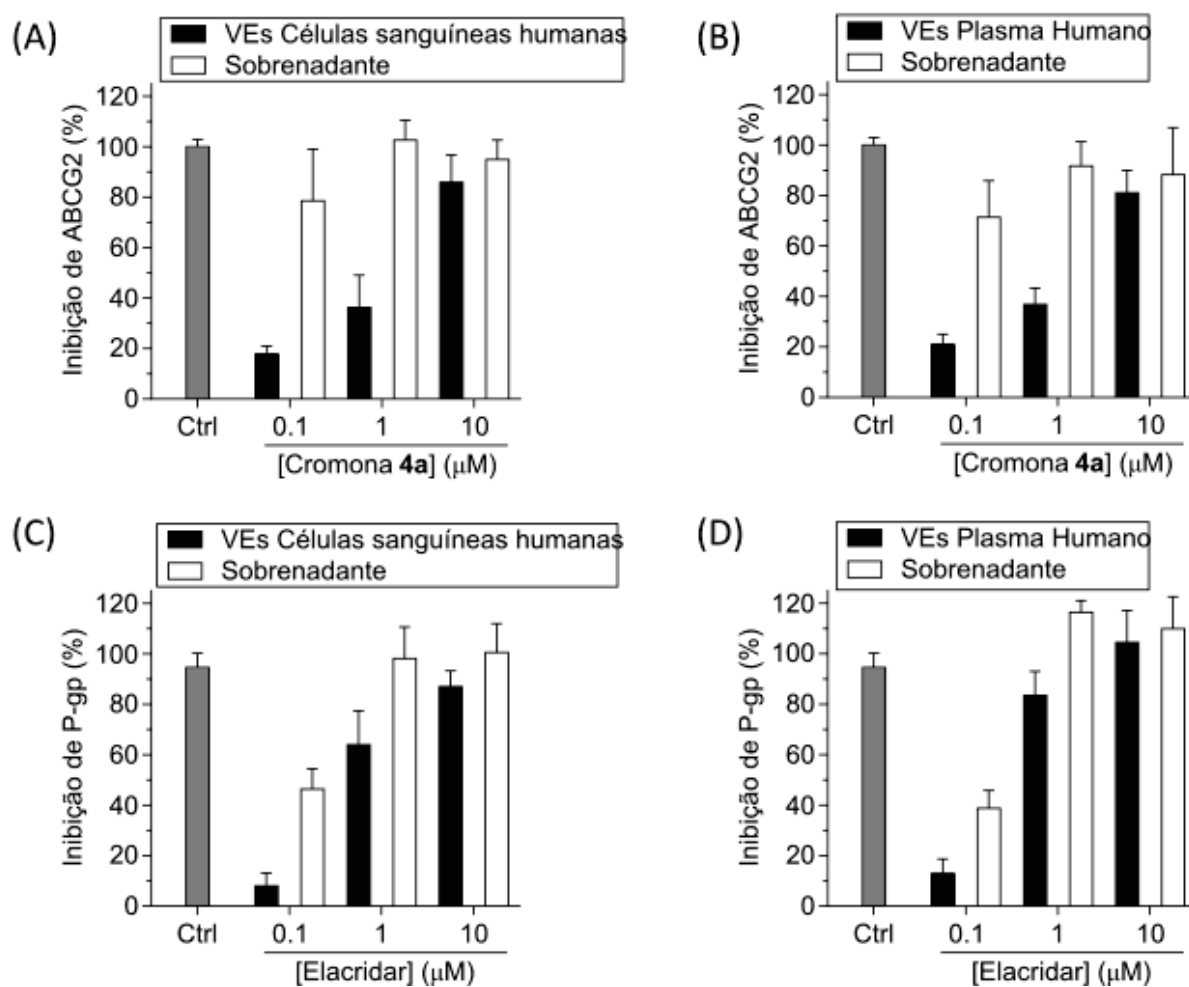
THIETART, Sara; RAUTOU, Pierre-emmanuel. Review Extracellular vesicles as

- biomarkers in liver diseases : A clinician ' s point of view. **J Hepatol.** v. 73, p. 1507–1525, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.014>
- TIAN, Yanhua *et al.* Biomaterials A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2383–2390, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
- TURTURICI, Giuseppina *et al.* Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication : advantages and disadvantages. **Am J Physiol Cell Physiol.** p. 621–633, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2013>
- USMAN, Waqas Muhammad *et al.* Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. **Nature Communications**, v. 9, p. 2359, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04791-8>
- UTLEG, Angelita G. *et al.* Proteomic Analysis of Human Prostatomes. **Prostate.** v. 161, n. January, p. 150–161, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pros.10255>
- VALADI, Hadi *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol.** v. 9, n. 6, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- VALDAMERI, Glaucio *et al.* Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 55, n. 2, p. 966-970, 2012.
- VIPPAGUNTA, Sudha R. *et al.* Factors Affecting the Formation of Eutectic Solid Dispersions and Their Dissolution Behavior. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 96, n. 2, p. 294–304, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps>
- WOLFERS, JOSEPH *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p. 297–303, 2001.
- YONG, Tuying *et al.* Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. **Nature Communications**, v. 10, p. 3038, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11718-4>
- ZATTONI, Ingrid Fatima *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Targeting breast cancer resistance protein (BCRP / ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 237, n. March, p. 114346, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114346>
- ZHAI, Zheng *et al.* Erythrocyte-mimicking paclitaxel nanoparticles for improving biodistributions of hydrophobic drugs to enhance antitumor efficacy. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 387–399, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1731862>
- ZHANG, Gensheng *et al.* Extracellular vesicles : Natural liver-accumulating drug delivery vehicles for the treatment of liver diseases. **J Extracell Vesicles.** v. 10, n.2, p. 12030. October, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jev2.12030>
- ZHANG, Xinxin *et al.* Drug Delivery Remote Loading of Small-Molecule Therapeutics into Cholesterol- Enriched Cell-Membrane-Derived Vesicles. **Angew Chem Int Ed Engl.** v. 56, n. 45, p. 14075–14079, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201707598>
- ZHUANG, Manjiao *et al.* SPION-Decorated Exosome Delivered BAY55-9837 Targeting the Pancreas through Magnetism to Improve the Blood GLC Response. **Small** v. 1903135, p. 1–14, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/sml.201903135>

FIGURAS

Figura 1



FORMULÁRIO DE ATENDIMENTO – PEDIDO DE PATENTE

1. TÍTULO DA INVENÇÃO			
VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO COMO VEÍCULOS DE ENTREGA DE DROGAS HIDROFÓBICAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO			
2. BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO			
A presente invenção diz respeito ao uso de vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células sanguíneas e plasma humano como veículos para a entrega de drogas (<i>drug delivery</i>), a fim de possibilitar o uso pré-clínico e clínico de compostos com relevante atividade biológica <i>in vitro</i> , porém, com característica físico-química de baixa solubilidade em água.			
3. CÓDIGO NA CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE PATENTES CONSULTAR NO SITE HTTP://IPC.INPI.GOV.BR			
A61P	Necessidades Humanas		Física
	Química; Metalurgia		Eletricidade
	Têxteis; Papel		Construções Fixas
	Operações de Processamento; Transporte		Engenharia Mecânica; Iluminação; Aquecimento; Armas; Explosão
4. PALAVRAS-CHAVE - PARA UTILIZAÇÃO NA VITRINE TECNOLÓGICA DA UFPR			
Formulação farmacêutica, vesículas extracelulares, <i>drug delivery</i> , drogas hidrofóbicas, inibidores dos transportadores ABC.			
5. CONTATO PRINCIPAL			
Nome:	Glaucio Valdameri		
Telefones:	(41) 9 9133 2283		
Email's:	gvaldameri@ufpr.br / glaucio_valdameri@hotmail.com		
☒ X	Professor	☐	Estudante
☐	Outro		
6. QUAL PROBLEMA VOCÊ BUSCOU RESOLVER?			
O câncer ocupa a segunda posição entre as doenças com maior mortalidade mundial. Em 2018 estimou-se que ocorreriam mais de 18 milhões de mortes no mundo em decorrência dessa doença. Para os anos 2020 a 2022, estima-se que ocorrerão 625 mil novos casos anuais de câncer no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente, seguido de mama e próstata. Esse quadro é ainda agravado pela ocorrência de resistência a múltiplas drogas, cujo principal causador é a superexpressão de transportadores ABC. A expressão de transportadores ABC em diversos tipos de câncer é associada à diminuição da sobrevida do paciente oncológico. Nesse contexto, o desenvolvimento de inibidores dos transportadores ABC é urgente. Entretanto, testes clínicos com muitos dos inibidores identificados em sistema <i>in vitro</i> são inviabilizados devido as características destes compostos, normalmente hidrofóbicos e insolúveis em água. As VEs presentes no plasma e obtidas de células sanguíneas foram capazes de carrear o ativo e promover inibição do transportador, similarmente aos testes realizados com o composto livre e solubilizado em solvente orgânico.			
7. QUAL A APLICAÇÃO DESTA INVENÇÃO?			
A sociedade poderá se beneficiar com o desenvolvimento de uma tecnologia inovadora para a perfusão de fármacos hidrofóbicos.			
8. EXISTE ALGO SIMILAR NO MERCADO? BASEADO NA BUSCA DE ANTERIORIDADE.			

CITAR AS FONTES UTILIZADAS PARA BUSCA DE ANTERIORIDADE (BANCO DE PATENTES / BASE DE DADOS)

Pesquisa no site do Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI (<https://www.gov.br/inpi/pt-br>).

1. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - VESÍCULA EXTRACELULAR LIGADA A MOLÉCULAS E USOS DA MESMA. Pedido Nº: BR 11 2022 002599 8 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1645680&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
2. INSTITUTO BUTANTAN (BR/SP) - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (VAA) QUE POSSIBILITA O ACOPLAMENTO DE UM OU MAIS ANTÍGENOS. Pedido Nº: BR 10 2020 013216 4 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1581066&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
3. CELULARITY INC. (US) - EXOSSOMOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS. Pedido Nº: BR 11 2021 025512 5 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1639770&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
4. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA DISTRIBUIÇÃO DE VACINA. Pedido Nº: BR 11 2021 018694 8 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1627727&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
5. GENENTECH, INC. (US) - ENSAIO PARA DETECTAR UMA PROTEÍNA ASSOCIADA À MEMBRANA, MÉTODOS PARA QUANTIFICAR A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA CIRCULANTE, PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE COM LINFOMA DE CÉLULAS B TEM PROBABILIDADE DE EXIBIR UMA RESPOSTA A UMA TERAPIA ANTI-CD20, PARA DETERMINAR A AFINIDADE DE UM ANTICORPO ANTI-CD20, PARA DETERMINAR A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T E MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM TUMOR. Pedido Nº : BR 11 2021 017144 4 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1625069&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
6. DIRECT BIOLOGICS LLC (US) - MÉTODO PARA TRATAR OSTEOARTRITE COM UMA COMBINAÇÃO DE EXOSSOMOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS, CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS SINOVIAIS E ANDAIMES. Pedido Nº: BR 11 2021 015549 0 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1622024&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
7. DIRECT BIOLOGICS LLC (US) - MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE EXOSSOMOS ESPECÍFICOS E PRODUTOS DE FATOR DE CRESCIMENTO. Pedido Nº: BR 11 2021 014994 5 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1620988&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
8. OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (US) - NANOCARREADORES PARA TERAPIA DE INFLAMAÇÃO PULMONAR. Pedido Nº: BR 11 2021 007285 3 A2 -

- <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1609166&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
9. OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (US) - VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA TERAPIAS DIRECIONADAS CONTRA CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DE MIELOIDE. Pedido Nº: BR 11 2021 007287 0 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1609167&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 10. TIMOTHY A. BERTRAM (KY) / DEEPAK JAIN (US) - COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VESÍCULAS DERIVADAS DE CÉLULAS E USOS DAS MESMAS. Pedidos Nº : BR 11 2021 002703 3 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1603408&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 11. EVERCYTE GMBH (AT) - VESÍCULAS EXTRACELULARES ESPECÍFICAS ALVO (TEV), UMA PREPARAÇÃO, UMA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DA VESÍCULA EXTRACELULAR ESPECÍFICA ALVO, UM DOMÍNIO EXTRAVESICULAR ESPECÍFICO ALVO DA MESMA. CODIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, BIBLIOTECA DE TEV, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA E SUA UTILIZAÇÃO; MÉTODOS DE PRODUÇÃO. Pedido Nº: BR 11 2021 002710 6 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1603423&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 12. OMNISPIRANT LIMITED (IE) - VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA INALAÇÃO. Pedido Nº: BR 11 2021 002286 4 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1602806&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 13. THERAMIR LTD (CY) - TERAPIA À BASE DE MICRORNA DIRECIONADA A CÂNCERES POSITIVOS PARA LCP-1. Pedido Nº: BR 11 2021 002321 6 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1602874&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 14. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO (BR/SP) - MÉTODO PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS DESUPERFÍCIE EM CÉLULAS DE BLASTOCISTO DE MAMÍFEROS. Pedido Nº: BR 10 2019 016477 8 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1518920&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 15. ALIA THERAPEUTICS S.R.L. (IT). VESÍCULAS PARA DISPENSAÇÃO SEM TRAÇO DE MOLÉCULAS DE RNA GUIA E/OU COMPLEXO(S) DE NUCLEASE GUIADA POR RNA/MOLÉCULA DE RNA GUIA E MÉTODO DE PRODUÇÃO DAS MESMAS. Pedido Nº: BR 11 2021 000408 4 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1600574&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 16. UNIVERSITY OF MIAMI (US) - COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES RELACIONADAS COM O INFLAMASSOMA. Pedido Nº: BR 11 2020 026798 8 A2 -

- <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1599702&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
17. EXOPHARM LIMITED (AU) - MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PURIFICAÇÃO OU ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMAS. Pedido Nº: BR 11 2020 026067 3 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1598857&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 18. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - VESÍCULAS EXTRACELULARES MODIFICADAS E USOS DAS MESMAS. Pedido Nº: BR 11 2021 009231 5 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1611611&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 19. EXOSOMICS S.P.A (IT) - USO IN VITRO DE FIBRAS OCAS, MÉTODO IN VITRO PARA OBTENÇÃO DE SANGUE OU DE UM DERIVADO DE SANGUE E MÉTODO IN VITRO PARA ANALISAR O TEOR DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE UM SANGUE OU AMOSTRA LÍQUIDA DERIVADA DE SANGUE. Pedido Nº: BR 11 2020 020083 2 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1590432&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 20. BRUNELLA SILY DE ASSIS BUMACHAR (BR/ES) / ALEXANDRE JOSÉ SERAFIM (BR/ES) - PROCESSO DE BIOFUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES DE TITÂNIO OU LIGAS DE TITÂNIO. Pedido Nº: BR 10 2019 006252 5 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1506274&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 21. BRUNELLA SILY DE ASSIS BUMACHAR (BR/ES) / ALEXANDRE JOSÉ SERAFIM (BR/ES) - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FATORES INDUTIVOS PARA USO NA REGENERAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA. Pedido Nº: BR 10 2019 005811 0 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1505786&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 22. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - VESÍCULAS EXTRACELULARES COMPREENDENDO AGONISTA DE STING. Pedido Nº: BR 11 2020 019089 6 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1589054&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 23. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS. Pedido Nº: BR 11 2020 016228 0 A2 <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1584932&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
 24. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - EXOSSOMOS PARA IMUNO-ONCOLOGIA E TERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA. Pedido Nº: BR 11 2020 013131 8 A2 - <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1580981&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>

25. CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU) - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO DE SELEÇÃO DE PACIENTES COM CÂNCER. Pedido Nº: BR 11 2020 013036 2 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1580875&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
26. DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR DE MINISTER VAN VWS, MINISTERIE VAN VOLKSGEZONDHEID, WELZIJN EN SPORT (NL) - PROCESSO APRIMORADO PARA PRODUIR VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA. Pedido Nº: BR 11 2020 011019 1 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1578499&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
27. EVOX THERAPEUTICS LTD (GB) - VESÍCULAS EXTRACELULARES MODIFICADAS GENETICAMENTE POR PROTEÍNA. Pedido Nº: BR 11 2020 007327 0 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1574118&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
28. EVOX THERAPEUTICS LTD (GB) - DISTRIBUIÇÃO MEDIADA POR VE DE CONJUGADOS DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO-MOLÉCULA PEQUENA. Pedido Nº: BR 11 2019 000528 5 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1499407&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
29. LYSATPHARMA GMBH (DE) - VESICULAS DERIVADAS DE LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS PARA USO EM MEDICINA. Pedido Nº: BR 11 2018 075295 9 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1495408&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
30. EVOX THERAPEUTICS LTD (GB) / OXFORD UNIVERSITY INNOVATION (GB) - EXOSSOMOS COMPREENDENDO POLIPEPTÍDEOS TERAPÊUTICOS. Pedido Nº: BR 11 2018 074229 5 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1494090&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
31. ORTHOGEN AG (DE) - PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA ANTIENVELHECIMENTO. Pedido Nº: BR 11 2019 002080 2 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1501279&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
32. UNICYTE EV AG (CH) - VEÍCULOS FARMACÊUTICOS CONTENDO mIRNAS PARA USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS FIBRÓTICAS CAUSADAS POR HIPERGLICEMIA. Pedido Nº: BR 11 2018 072797 0 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1492432&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>
33. CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US) - VESÍCULAS DE MEMBRANA TERAPÊUTICA. Pedido Nº: BR 11 2018 068746 4 A2 -
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1487449&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>

34. UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. (US) / ARUNA BIOMEDICAL, INC. (US) - VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULA NEURAL. Pedido Nº: BR 11 2018 009891 4 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1476271&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1476271&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
35. BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US) - USO DE EXOSSOMOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA. Pedido Nº: BR 11 2017 026467 6 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1438441&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1438441&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
36. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (BR/RJ) - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA. Pedido Nº: BR 10 2016 008109 2 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1375580&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1375580&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
37. EXOSOMICS S.P.A. (IT) - MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO IN VITRO DA PRESENÇA DE UM TUMOR, MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO IN VITRO DO ESTADO DE TRANSFORMAÇÃO DE TUMOR, VESÍCULAS EXTRACELULARES TM9SF4-POSITIVAS E KIT PARA USO NA DETERMINAÇÃO IN VITRO DA PRESENÇA DE UM TUMOR OU UM ESTADO DE TRANSFORMAÇÃO DE TUMOR. Pedido Nº: BR 11 2016 028581 6 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1402684&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1402684&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
38. ZHONG LI (JP) / MISAOKO KATSURA (JP) - MICROVESÍCULA, MÉTODO PARA PRODUÇÃO E USO DA MESMA. Pedido Nº: BR 11 2015 022189 0 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1347859&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1347859&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
39. EXOSOME DIAGNOSTICS, INC. (US) - MÉTODOS PARA ISOLAR MICROVESÍCULAS. Pedido Nº: BR 11 2015 016136 7 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1070154&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1070154&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXT%20RACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
40. THROMBOTARGETS EUROPE, S.L. (ES) - MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA MICROVESÍCULA SUPTANDO TF TENDO ATIVIDADE PRÓ-COAGULANTE, MICROVESÍCULAS OBSTIDAS PELO DITO METODO E SEU USO, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E KIT AS COMPREENDENDO. Pedido Nº: BR 11 2012 026907 0 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=935207&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXTR ACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=935207&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXTR%20ACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)
41. Orthogen Ag (DE) PREPARAÇÕES DE COMBINAÇÕES COM EXOSSOMOS E CORTICOSTERÓIDE. Pedido Nº: BR 11 2012 014066 3 A2 - [https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=907872&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXTR ACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=907872&SearchParameter=MICROVES%20CDCULAS,%20EXOSSOMOS,%20VESICULAS%20EXTR%20ACELULARES%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=)

1. Incorporação de paclitaxel carregado por vesícula extracelular em células tumorais - Kim, M. S.; Haney, M. J.; Zhao, Y.; Mahajan, V.; Deygen, I.; Klyachko, N. L.; Inskoe, E.; Piroyan, A.; Sokolsky, M.; Okolie, O.; et al. Development of Exosome-Encapsulated Paclitaxel to Overcome MDR in Cancer Cells. <i>Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.</i> 2016, 12 (3), 655–664. 2. Incorporação de celastrol carregado por vesícula extracelular em células de câncer de pulmão - Aqil, F.; Kausar, H.; Agrawal, A. K.; Jeyabalan, J.; Kyakulaga, A.-H.; Munagala, R.; Gupta, R. Exosomal Formulation Enhances Therapeutic Response of Celastrol against Lung Cancer. <i>Exp. Mol. Pathol.</i> 2016, 101 (1), 12–21. 3. Incorporação de Doxorubicina carregada por vesícula extracelular em células tumorais - Tian, Y.; Li, S.; Song, J.; Ji, T.; Zhu, M.; Anderson, G. J.; Wei, J.; Nie, G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. <i>Biomaterials.</i> 2014, 35(7); 2383-90. 4. Exossomo decorado com SPION entregue BAY55-9837 visando o pâncreas através do magnetismo para melhorar a resposta ao GLC no sangue - Zhuang M, Du D, Pu L, Song H, Deng M, Long Q, Yin X, Wang Y, Rao L. SPION-Decorated Exosome Delivered BAY55-9837 Targeting the Pancreas through Magnetism to Improve the Blood GLC Response. <i>Small.</i> 2019, 15(52). 5. Carregamento de pequenas moléculas em vesículas derivadas de membranas de células enriquecidas com colesterol - Zhang X, Angsantikul P, Ying M, Zhuang J, Zhang Q, Wei X, Jiang Y, Zhang Y, Dehaini D, Chen M, Chen Y, Gao W, Fang RH, Zhang L. Remote Loading of Small-Molecule Therapeutics into Cholesterol-Enriched Cell-Membrane-Derived Vesicles. <i>Angew Chem Int Ed Engl.</i> 2017, 56(45); 14075-14079. 6. Vesículas derivadas de glóbulos vermelhos para entrega de camptotecina - Malhotra S, Dumoga S, Sirohi P, Singh N. Red Blood Cells-Derived Vesicles for Delivery of Lipophilic Drug Camptothecin. <i>ACS Appl Mater Interfaces.</i> 2019, 11(25); 22141-22151.	
9. QUAL O POTENCIAL ECONÔMICO DA INVENÇÃO? INFORMAR POSSÍVEIS MERCADOS E INTERESSES TÉCNICOS.	
O produto representa uma abordagem inovadora para realizar o <i>drug delivery</i> de moléculas hidrofóbicas, possuindo assim um altíssimo valor de mercado. Os maiores interessados no produto são as indústrias farmacêuticas.	
10. QUAIS EMPRESAS PODERIAM SE INTERESSAR EM PRODUZIR / COMERCIALIZAR SUA INVENÇÃO?	
Indústrias farmacêuticas.	
11. QUAIS SÃO OS OBJETIVOS E INTERESSES DO GRUPO DE INVENTORES NO DESENVOLVIMENTO DESTA PATENTE?	
	Exploração direta por algum membro do grupo
X	Transferência de tecnologia para terceiros

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

DADOS DO DEPOSITANTE					
Razão Social	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ				
CNPJ	75.095.679/0001-49				
Qualificação	Órgão Público				
Endereço	Rua João Negrão, 280 - 2º andar				
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná	CEP	81.010-200
Telefone	41 3360-7441	e-mail do NIT	coord.pi@ufpr.br		

	Não houve participação de outras instituições
X	Houve participação de outras instituições

Se houve a participação de outras Instituições (professores de outras instituições) no desenvolvimento da invenção/tecnologia, preencher os dados da Instituição e enviar o Instrumento Jurídico utilizado para a formalização da parceria.

INSTITUIÇÃO PARCEIRA					
Razão Social	Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR.				
CNPJ	33.781.055/0065-08				
Qualificação	Órgão público				
Endereço	Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, bairro CIC.				
Cidade	Curitiba	Estado	Parana	CEP	81350-010
Telefone	41 33163230	e-mail do NIT	nit.icc@fiocruz.br		

DADOS DA PATENTE					
Natureza	X	Invenção		Modelo de Utilidade	
Certificado de Adição					
Título da Invenção (Escrever o título completo, que deverá ser igual ao do Relatório Descritivo e do Resumo)					
Formulação farmacêutica baseada em microvesículas de células sanguíneas e plasma humano					
Qual o número da Figura a publicar juntamente com o resumo:					1

O pedido enquadra-se como Patente Verde?	
Consultar lista em http://antigo.inpi.gov.br/menu-servicos/patente/patentes-verdes-v2.0	
	Sim. Qual item da lista? _____
X	Não

Declaração de Divulgação anterior não prejudicial ¹	
X	Não houve divulgação anterior
	Houve Divulgação anterior
Onde e Quando	

Listagem de Sequências Biológicas ²	
X	Não há sequência biológica
	Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgados no pedido de patente, conforme depositado.

Material Biológico ³	
X	Não há material biológico depositado
	Declaro que o relatório descritivo suplementado por depósito de material biológico está conforme parágrafo único do Art. 24 da Lei 9.279/96

Acesso ao Patrimônio Genético ⁴		
X	Declaração NEGATIVA de acesso	Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.
	Declaração POSITIVA de acesso	Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:
	Número da Autorização de Acesso:	
	Data da Autorização de Acesso:	
	Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso:	
DADOS DOS INVENTORES		
Número Total de inventores		05

(Copiar o quadro de dados e assinatura em tantas folhas quanto forem necessárias para atender o número total de Inventores)

PREENCHER NA ORDEM DE IMPORTÂNCIA, POIS SERÁ ESSA ORDEM QUE APARECERÁ NO PEDIDO DE PATENTE

¹ A quadrícula de "Declaração de divulgação anterior não prejudicial" só deve ser marcada se o depositante estiver fazendo jus ao "Período de Graça" previsto no Artigo 12 da Lei 9279/96, que consiste no direito de depositar o pedido em até 12 meses contados a partir da primeira divulgação da invenção requerida.

² As Proteínas, o DNA e o RNA são caracterizados através da sua sequência de aminoácidos e nucleotídeos, portanto, caso a invenção contenha essas moléculas é necessário que suas Sequências Biológicas sejam apresentadas no formato de uma listagem.

³ Quando a invenção contiver material biológico essencial à sua realização, a descrição completa deste pode ser impossível de ser alcançada na forma escrita. Nesses casos, o usuário deverá realizar Depósito do Material Biológico em alguma instituição fiel depositária autorizada pelo INPI, indicada em acordo internacional, sujeito à aprovação prévia e interna.

⁴ Para definições e mais informações acesse: <http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico>

Para ajudar a definir o % de cada participante, levar em consideração:

- Número de pesquisadores de cada instituição envolvidos no desenvolvimento da invenção
- Instalações físicas onde ocorreram as pesquisas
- Qual instituição investiu recurso financeiro direto na pesquisa
- Qual o conhecimento pré-existente de cada instituição sobre o objeto da pesquisa

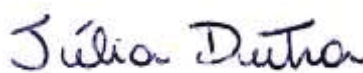
INVENTOR 01

Nome	Júlia de Paula Dutra				
CPF	10364602902		% de participação no projeto		20%
Qualificação	Mestranda				
Instituição	Universidade Federal do Paraná		Setor	Ciências da Saúde	
Departamento	Análises Clínicas		Laboratório	Imunologia Clínica	
Endereço	R. Maria Luiza Bazzani Natal		Nacionalidade	Brasileira	
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná		CEP 81.540-540
Telefone	-	Celular	(41) 99186-4442		
E-mail's	juliadutra@ufpr.br				

Declaro, sob as penas da Lei, que as informações prestadas acima são verdadeiras e autorizo a UFPR a requerer o pedido de patente como titular dos direitos, na forma e para os fins do disposto na Lei da Propriedade Industrial (Lei 9.279/96).

Declaro estar ciente, também, que o direito participação dos criadores nos ganhos econômicos resultantes de possível exploração da patente não se incorpora, a qualquer título, ao salário.

Por fim, caso seja hipótese de cotitularidade do pedido de patente entre a UFPR e outra instituição pública ou privada, autorizo a Agência de Inovação UFPR a negociar os eventuais contratos de licenciamento resultantes da possível exploração da patente.



ASSINATURA

INVENTOR 02

INVENTOR 02

Nome	Vivian Rotuno Moure				
CPF	993.421.031-20		% de participação no projeto	20%	
Qualificação	Professora				
Instituição	Universidade Federal do Paraná		Setor	Ciências da Saúde	
Departamento	Análises Clínicas		Laboratório	Imunologia Clínica	
Endereço	Rua Goiânia 1253, Ap106A		Nacionalidade	Brasileira	
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná	CEP	82940-150
Telefone		Celular	41 991332283		
E-mail's	Vivian.moure@ufpr.br / vivianmoure@gmail.com				

Declaro, sob as penas da Lei, que as informações prestadas acima são verdadeiras e autorizo a UFPR a requerer o pedido de patente como titular dos direitos, na forma e para os fins do disposto na Lei da Propriedade Industrial (Lei 9.279/96).

Declaro estar ciente, também, que o direito participação dos criadores nos ganhos econômicos resultantes de possível exploração da patente não se incorpora, a qualquer título, ao salário.

Por fim, caso seja hipótese de cotitularidade do pedido de patente entre a UFPR e outra instituição pública ou privada, autorizo a Agência de Inovação UFPR a negociar os eventuais contratos de licenciamento resultantes da possível exploração da patente.

Ivan Roberto Mauro Valdameri

ASSINATURA

INVENTOR 03

Nome	Glaucio Valdameri				
CPF	006.582.740-66		% de participação no projeto	20%	
Qualificação	Professor				
Instituição	Universidade Federal do Paraná		Setor	Ciências da saúde	
Departamento	Análises Clínicas		Laboratório	Imunologia Clínica	
Endereço	Rua Goiânia 1253, Ap106A		Nacionalidade	Brasileira	
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná	CEP	82940-150
Telefone		Celular	41 991332283		
E-mail's	gvaldameri@ufpr.br / glaucio_valdameri@hotmail.com				

Declaro, sob as penas da Lei, que as informações prestadas acima são verdadeiras e autorizo a UFPR a requerer o pedido de patente como titular dos direitos, na forma e para os fins do disposto na Lei da Propriedade Industrial (Lei 9.279/96).

Declaro estar ciente, também, que o direito participação dos criadores nos ganhos econômicos resultantes de possível exploração da patente não se incorpora, a qualquer título, ao salário.

Por fim, caso seja hipótese de cotitularidade do pedido de patente entre a UFPR e outra instituição pública ou privada, autorizo a Agência de Inovação UFPR a negociar os eventuais contratos de licenciamento resultantes da possível exploração da patente.


Prof. Dr. Glaucio Valdameri
 Vice-Coordenador do PPG em Ciências Farmacéuticas
 Universidade Federal do Paraná
 Matrícula 305119

ASSINATURA

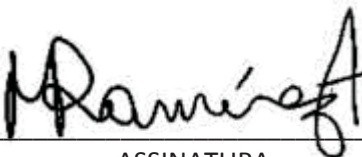
INVENTOR 04

Nome	Marcel Ivan Ramirez Araya				
CPF	176111658-44		% de participação no projeto		20%
Qualificação	Pesquisador				
Instituição	Instituto Carlos Chagas		Setor		
Departamento			Laboratório	Biologia Molecular e sistemática de tripanossomatídeos	
Endereço	Rua Palmeiras 86 apto 804		Nacionalidade	Chileno-brasileiro	
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná	CEP	80620110
Telefone		Celular	41 997647613		
E-mail's	marcel.ivan.ramirez@gmail.com				

Declaro, sob as penas da Lei, que as informações prestadas acima são verdadeiras e autorizo a UFPR a requerer o pedido de patente como titular dos direitos, na forma e para os fins do disposto na Lei da Propriedade Industrial (Lei 9.279/96).

Declaro estar ciente, também, que o direito participação dos criadores nos ganhos econômicos resultantes de possível exploração da patente não se incorpora, a qualquer título, ao salário.

Por fim, caso seja hipótese de cotitularidade do pedido de patente entre a UFPR e outra instituição pública ou privada, autorizo a Agência de Inovação UFPR a negociar os eventuais contratos de licenciamento resultantes da possível exploração da patente.



ASSINATURA

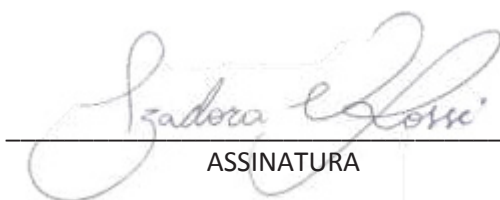
INVENTOR 05

Nome	IzadoraVolpato Rossi				
CPF	103.416-779-06		% de participação no projeto		20%
Qualificação	Doutoranda				
Instituição	Universidade Federal do Paraná		Setor	Ciências Biológicas	
Departamento	Biologia Celular e Molecular		Laboratório	EVAHPI	
Endereço	R. Cel Francisco H. dos Santos		Nacionalidade	Brasileira	
Cidade	Curitiba	Estado	Paraná	CEP	81530-000
Telefone		Celular	44 9983-7266		
E-mail's	izadoravolpato@gmail.com				

Declaro, sob as penas da Lei, que as informações prestadas acima são verdadeiras e autorizo a UFPR a requerer o pedido de patente como titular dos direitos, na forma e para os fins do disposto na Lei da Propriedade Industrial (Lei 9.279/96).

Declaro estar ciente, também, que o direito participação dos criadores nos ganhos econômicos resultantes de possível exploração da patente não se incorpora, a qualquer título, ao salário.

Por fim, caso seja hipótese de cotitularidade do pedido de patente entre a UFPR e outra instituição pública ou privada, autorizo a Agência de Inovação UFPR a negociar os eventuais contratos de licenciamento resultantes da possível exploração da patente.



ASSINATURA

TERMO DE RESPONSABILIDADE

Eu, Glaucio Valdameri, CPF 006582740-66, inventor, comprometo-me a dar todo o suporte necessário à Agência de Inovação da UFPR no processo de proteção e transferência de tecnologia referente ao invento “VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO COMO VEÍCULOS DE ENTREGA DE DROGAS HIDROFÓBICAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO”, de minha cocriação a ser protocolado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI.

O suporte necessário à Agência de Inovação UFPR consiste na garantia, por parte do inventor, de fornecimento de informações, dados, planilhas, métodos, resultados e demais elementos que se mostrem imprescindíveis ao prosseguimento do processo de transferência de tecnologia, cumprimento de exigências e esclarecimentos do processo de proteção, junto ao INPI, quando necessário.

Com relação aos prazos de respostas a solicitações elaboradas pela Agência de Inovação UFPR, como: resposta à Opinião Preliminar e aos despachos de exame técnico e formal do INPI, estou ciente que a não manifestação acarretará em desistência da condução do processo da UFPR e posterior arquivamento do pedido.

Comprometo-me também a manter meus dados (endereço, telefones e e-mails) atualizados junto à Agência de Inovação UFPR.

Por ter ciência inequívoca do compromisso assumido perante a Agência de Inovação UFPR firmo, sem ressalvas, e sob as penas da lei, o presente termo de responsabilidade.

Curitiba, 02 de agosto de 2022.

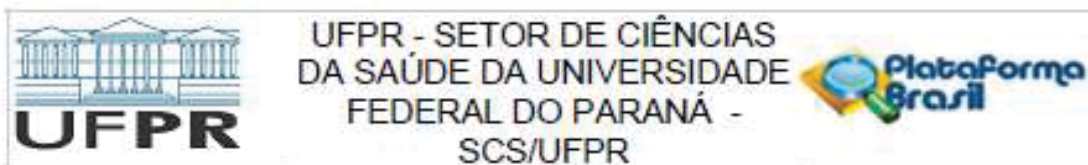


Prof. Dr. Glaucio Valdameri
Universidade Federal do Paraná
Mat. 205119

Glaucio Valdameri

APÊNDICE

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da estabilidade de inibidores dos transportadores ABC em plasma humano e formulação farmacêutica baseada em microvesículas de células sanguíneas.

Pesquisador: GLAUCIO VALDAMERI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51428521.2.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.006.955

Apresentação do Projeto:

O projeto em análise ética tem como título "Avaliação da estabilidade de inibidores dos transportadores ABC em plasma humano e formulação farmacêutica baseada em microvesículas de células sanguíneas" sob responsabilidade do Prof. Dr. Glaucio Valdameri do PPG em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Como membros da pesquisa foram incluídos Ingrid F. Zattoni, Marcel Araya, Vivien Moure, Maria ALice F. Nunes, Bruna Sabatke, Izadora Rossi e Julia de Paula Dutra, além de Diogo Kita.

Projeto a ser desenvolvido a partir de sua aprovação até o mês de dezembro de 2025.

Objetivo da Pesquisa:

São objetivos do projeto mencionados pelos pesquisadores em seu projeto:

*Objetivo Primário:

Avaliar a estabilidade de inibidores de transportadores ABC em plasma humano através de uma formulação farmacêutica baseada no preparo de microvesículas de células sanguíneas.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR



Continuação do Parecer: 5.006.965

Objetivo Secundário:

Selecionar os participantes da pesquisa para a coleta de sangue.

Padronizar o processamento das amostras e o preparo das microvesículas.

Avaliar o carreamento dos compostos ativos pelas microvesículas em sistema de cultivo celular.

Avaliar o desempenho dos inibidores quando incorporados às microvesículas, através de citometria de fluxo. Avaliar a degradação dos compostos ativos através da técnica de HPLC acoplado a espectrômetro de massas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para os participantes da pesquisa estão relacionados ao momento da coleta, já que existe a possibilidade de hematoma local e desconforto. Para o operador, existe o risco inerente a manipulação de materiais biológicos.

Benefícios:

A sociedade poderá se beneficiar a longo prazo com o desenvolvimento de uma tecnologia inovadora para perfusão de fármacos em pacientes oncológicos. Espera-se que esse estudo abra portas para estudos in vivo e ensaios clínicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

São citados os seguintes critérios de inclusão e exclusão para a participação da pesquisa:

"Critério de Inclusão:

Pessoas maiores de 18 anos e matriculadas no programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.

Critério de Exclusão:

Presença de comorbidades."

O recrutamento de participantes da pesquisa ser dará por meio "de e-mails enviados a todos os alunos de pós-graduação do programa de ciências farmacêuticas. A esses indivíduos será explicado o objetivo da pesquisa e a necessidade da coleta de sangue venoso. Os indivíduos serão indagados sobre a vontade de participação na pesquisa, respeitando a sua autonomia. Em caso afirmativo, será aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a coleta será agendada

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR



Continuação do Parecer: 5.006.955

conforme conveniência do participante e do responsável que fará a coleta."

O número de participantes da pesquisa será de 9 alunos de pós-graduação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados incluindo a anuência da responsável pelo "Laboratório de Bioquímica Clínica e Laboratório de Imunologia Clínica" e pelo "Departamento de Análises Clínicas".

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende às requisitos éticos e tem a aprovação por este comitê de ética.

Favor inserir em seu TCLE e TALE o número do CAAE e o número deste Parecer de aprovação, para que possa aplicar aos participantes de sua pesquisa, conforme decisão da Coordenação do CEP/SD de 13 de julho de 2020.

Após o isolamento, retomaremos à obrigatoriedade do carimbo e assinatura nos termos para novos projetos.

Considerações Finais a critério do CEP:

01 - Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais (a cada seis meses de seu parecer de aprovado) e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio).

02 - Importante: (Caso se aplique): Pendências de Coparticipante devem ser respondidas pelo acesso do Pesquisador principal.

Para projetos com coparticipante que também solicitam relatórios semestrais, estes relatórios devem ser enviados por Notificação, pelo login e senha do pesquisador principal no CAAE correspondente a este coparticipante, após o envio do relatório à instituição proponente.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

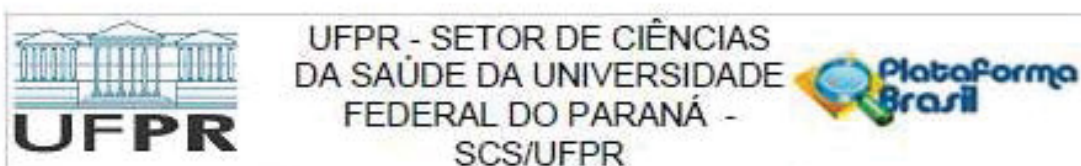
CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 5.008.965

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1817332.pdf	02/09/2021 23:35:18		Aceito
Outros	Concordancia_dos_servicos_envolvidos_laboratorios.pdf	02/09/2021 23:34:19	GLAUCIO VALDAMERI	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_do_pesquisador_ao_CEPED.pdf	02/09/2021 15:32:46	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Concordancia_dos_servicos_envolvidos_analises_clinicas.pdf	02/09/2021 13:48:36	GLAUCIO VALDAMERI	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	02/09/2021 13:46:14	GLAUCIO VALDAMERI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	02/09/2021 09:04:11	GLAUCIO VALDAMERI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_esclarecido.docx	02/09/2021 09:03:51	GLAUCIO VALDAMERI	Aceito
Declaração de concordância	AlteracaoAceiteCEP.pdf	02/09/2021 08:58:28	Gilse Elisangela da Silva de Souza	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Troca_de_Pesquisador_principal.pdf	02/09/2021 08:53:59	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Check_List_Documental.pdf	31/08/2021 21:02:54	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Termo_de_guarda_de_material_biologico.pdf	31/08/2021 20:52:27	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Declaracao_de_compromissos_equipe_pesquisa.pdf	31/08/2021 20:52:03	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Analise_do_merito_cientifico_a_ser_certificada_pelo_pesquisador_principal.pdf	31/08/2021 20:51:28	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito
Outros	Extrato_de_Ata_Projeto_EVs.pdf	31/08/2021 20:50:45	JULIA DE PAULA DUTRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR



Continuação do Parecer: 5.006.965

CURITIBA, 29 de Setembro de 2021

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br