

Title: Methods to quantify activities of clinically relevant membrane transporters *in vitro* and *in vivo*

Autor: Chih-hsuan Hsin

Date of the oral examination: 18.06.2021

Keywords: Drug-drug interactions, membrane transporters, cocktail approach clinical study, population pharmacokinetics modeling

Abstract:

The importance of membrane transporters in drug absorption, distribution, metabolism, and excretion has been increasingly emphasized during the last two decades, underlining that membrane transporters play an important role in drug development and clinical practice. Recent approaches based on clinical trials aim to indirectly evaluate relationships between a new molecular entity and membrane transporters by co-administering the new compound with one or multiple probe drugs. Probe drugs are substrates for which the absorption, distribution, and/or elimination are mediated by a specific membrane transporter in humans. A *cocktail approach* clinical trial is an efficient method to simultaneously assess several membrane transporters in a single clinical study. However, this approach has not been well established so far.

The objective of this thesis is to assess an improved *in vivo cocktail approach* which quantifies the activities of important human membrane transporters simultaneously, and to validate this approach by studying potential mutual drug-drug interactions (DDIs) and effects of transporter genotypes.

A clinical study in healthy volunteers was conducted, and cell-based *in vitro* assays were applied to study interactions between the drugs used as probe drugs in the clinical study. Adefovir dipivoxil, metformin, sitagliptin, pitavastatin, and digoxin were included in the clinical study to evaluate several membrane transporter activities simultaneously. This selection of probe drugs was made to reflect the activities of OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, MATE1, MATE2K, and P-gp. Overall, no clinically relevant interactions, but some minor DDIs were observed in the clinical study. Furthermore, findings from our *in vitro* evaluations of transporter mediated DDIs were in line with the clinical trial, confirming a low potential for clinically relevant DDIs between probe drugs. Moreover, as part of the validation, potential genotype effects on substrate pharmacokinetics were evaluated. To provide additional information on *ABCB1* genotype effects on intestinal and renal P-gp activity, the relationships between digoxin pharmacokinetics and common *ABCB1* SNP combinations was investigated using population pharmacokinetic modeling. Our evaluation supports the use of digoxin to characterize intestinal P-gp, while digoxin might not be an ideal substrate to quantify renal P-gp activity. It remains unclear whether other transporters play a more important role in the renal excretion of digoxin.

Finally, a membrane vesicle assay was developed and optimized to evaluate BSEP transporter activities, since a cell-based assay is not suitable for the ABC transporter activity evaluation. Afterwards, the potential inhibitory effects of the probe drugs used in the clinical trial on BSEP activity were evaluated, indicating a very low risk to cause drug-induced liver injury via BSEP inhibition.

The *in vitro* and *in vivo* methods that were established and optimized in this thesis could be useful tools to investigate the potential impact of new drug entities on a selection of clinically relevant transporters during drug development. Furthermore, the combination of *in vitro*, *in vivo*, and modeling approaches provides a solid foundation for further research on transporter mediated DDIs and transporter characteristics.

Abstrakt:

Die Bedeutung von Membrantransportern für die Absorption, Verteilung, den Metabolismus und die Exkretion von Arzneimitteln wurde in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend betont. Dies unterstreicht, dass Membrantransporter eine wichtige Rolle in der Arzneimittelentwicklung und in der klinischen Praxis spielen. Neuere Ansätze, die auf klinischen Studien basieren, zielen darauf ab, die Beziehungen zwischen neuen molekularen Entitäten und Membrantransportern indirekt zu bewerten, indem die neue Verbindung zusammen mit einem oder mehreren Phänotypisierungssubstraten verabreicht wird. Phänotypisierungssubstrate sind Substrate, bei denen die Absorption, Verteilung und/oder Exkretion durch einen spezifischen Membrantransporter beim Menschen vermittelt werden. Eine Cocktail-Phänotypisierungsstudie ist eine effiziente Methode, um mehrere Membrantransporter gleichzeitig in einer einzigen klinischen Studie zu bewerten. Dieser Ansatz ist jedoch noch nicht gut etabliert.

Das Ziel dieser Dissertation war es, eine verbesserte Cocktail-Phänotypisierungsstudie zu untersuchen, welche gleichzeitig die Aktivitäten wichtiger humaner Membrantransporter auswertet und diesen Ansatz durch die Untersuchung potenzieller Arzneimittelwechselwirkungen und Auswirkungen von Transporter-Genotypen zu validieren.

Eine klinische Studie wurde an gesunden Probanden durchgeführt und zellbasierte *in vitro* Assays wurden angewendet um Interaktionen zwischen Arzneimitteln, die in der klinischen Studie als Phänotypisierungssubstrate verwendet wurden, zu untersuchen. Adefovirdipivoxil, Metformin, Sitagliptin, Pitavastatin und Digoxin wurden in der klinischen Studie aufgenommen um die Aktivität mehrerer Membrantransporter gleichzeitig zu beurteilen. Diese Auswahl an Phänotypisierungssubstraten wurde getroffen, um die Aktivitäten von OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, MATE1, MATE2K und P-gp widerzuspiegeln. In der klinischen Studie wurden geringfügige, nicht klinisch relevante Wechselwirkungen beobachtet. Die Ergebnisse der *in vitro* Assays stimmten hinsichtlich transportervermittelter Wechselwirkungen mit der klinischen Studie überein und bestätigten ein geringfügiges Potenzial für klinisch relevante Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Phänotypisierungssubstraten. Darüber hinaus wurden im Rahmen der Validierung potenzielle Auswirkungen des Genotyps auf die Pharmakokinetik des Substrats untersucht. Um zusätzliche Informationen über die Auswirkungen des *ABCB1*-Genotyps auf die intestinale und renale P-gp-Aktivität zu gewinnen wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der Pharmakokinetik von Digoxin und häufig auftretenden *ABCB1* SNP-Kombinationen mit Hilfe populationspharmakokinetischer Modelle untersucht. Diese Auswertung unterstützt die Verwendung von Digoxin zur Charakterisierung von intestinalem P-gp, während Digoxin kein ideales Substrat zur Quantifizierung der renalen P-gp-Aktivität ist. Es bleibt unklar, ob andere Transporter eine wichtigere Rolle bei der renalen Ausscheidung von Digoxin spielen.

Schließlich wurde ein Membranvesikel-Assay entwickelt und optimiert, um die Aktivität von BSEP-Transportern zu quantifizieren, da ein zellbasiertes Assay für die ABC-Transporteraktivitätsbewertung nicht geeignet ist. Anschließend wurde die potenzielle Hemmung von BSEP durch die verwendeten Phänotypisierungssubstrate, was auf ein sehr geringes Risiko hindeutet, durch die BSEP-Hemmung eine arzneimittelinduzierte Leberschädigung zu verursachen

Die von mir etablierten und optimierten *in vitro*- und *in vivo*-Methoden können nützliche Werkzeuge sein, um die Auswirkungen neu entwickelter Arzneimittel auf die Aktivität einer Auswahl klinisch relevanter Transporter zu untersuchen. Darüber hinaus bietet die Kombination von *In-vitro*-, *In-vivo*- und Modellierungsansätzen eine solide Grundlage für die weitere Erforschung von Transporter-vermittelten Arzneimittelwechselwirkung und Transporter-Charakterisierung.