Reversible Dimers of the Atypical Antipsychotic Quetiapine Inhibit P-glycoprotein-mediated Efflux *in vitro* with Increased Binding Affinity and *in situ* at the Blood Brain Barrier

Dana Emmert,[†#] Christopher R. Campos,[‡#] David Ward,[§] Peihua Lu,[§] Hilda A. Namanja,[†] Kelsey Bohn,[†] David S. Miller,[‡] Frances J. Sharom,[§] Jean Chmielewski[†]* and Christine A. Hrycyna[†]*

[†]Department of Chemistry, Purdue University, 560 Oval Drive, West Lafayette, IN 47907, USA

[‡]Laboratory of Toxicology and Pharmacology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 27709, USA

[§]Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, N1G 2W1

[#]Both authors contributed equally to this work

CORRESPONDING AUTHOR: *To whom correspondence should be addressed (e-mail: hrycyna@purdue.edu; chml@purdue.edu)

Supplemental Information:

Flow cytometry experiments shown in Figures S1 – S3 were carried out as described in *Methods*. These data were used to generate IC_{50} values and dose response curves.

Figure S1

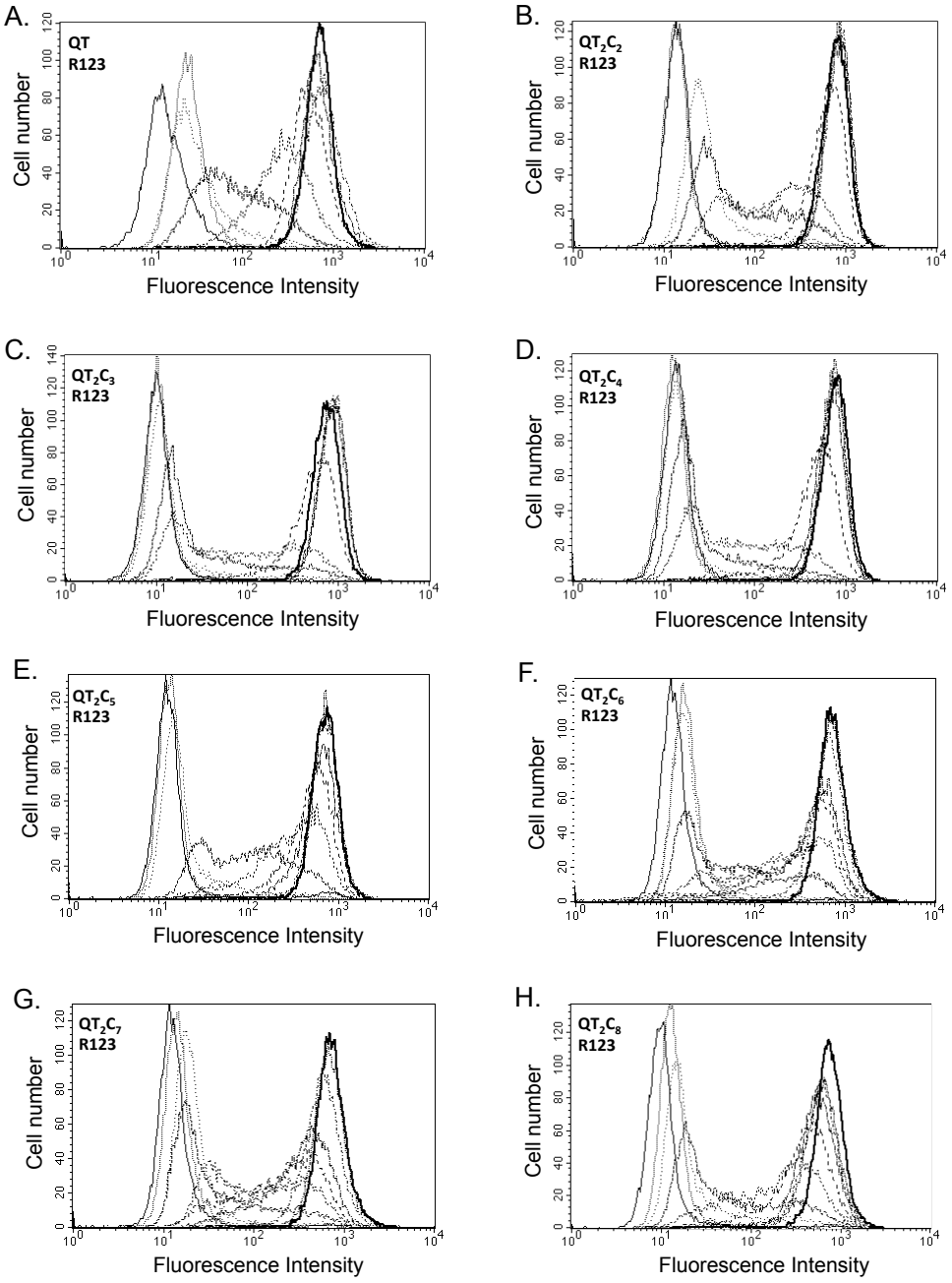

Figure S1: Dose response curves for MCF-7/DX1 cells treated with increasing concentrations of **(A)** QT with 0.5 μg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 10 μM QT, (. . . .) 25 μM QT, (-----) 50 μM QT, (- - -) 100 μM QT, (- - -) 200 μM QT, (-.-.-) 300 μM QT, (-..-..) 400 μM QT **(B)** QT_2C_2 with 0.5 μg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 0.1 μM QT_2C_2, (. . . .) 0.5 μM QT_2C_2, (-----) 0.75 μM QT_2C_2, (- - -) 1 μM QT_2C_2, (- - -) 2 μM QT_2C_2, (-.-.-) 3 μM QT_2C_2, (. - . -) 5 μM QT_2C_2, (-..-..) 10 μM QT_2C_2 **(C)** QT_2C_3 with 0.5 μg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 0.1 μM QT_2C_3, (. . . .) 0.5 μM QT_2C_3, (-----) 0.75 μM QT_2C_3, (- - -) 1 μM QT_2C_3, (- - -) 2 μM QT_2C_3, (-.-.-) 10 μM QT_2C_3, (. - . -) 25 μM QT_2C_3, (-..-..) 50 μM QT_2C_3, and **(D)** QT_2C_4 with 0.5 μg/mL rhodamine 123 : (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918 μM QT_2C_4, (.....) 0.1 μM QT_2C_4, (. . . .) 0.5 μM QT_2C_4, (-----) 0.75 μM QT_2C_4, (- - -) 1 μM QT_2C_4, (- - -) 2 μM QT_2C_4, (-.-.-) 3 μM QT_2C_4, (. - . -) 5 μM QT_2C_4, (-..-..) 10 μM QT_2C_4 **(E)** QT_2C_5 with 0.5 μg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 0.1 μM QT_2C_5, (. . . .) 1 μM QT_2C_5, (-----) 2 μM QT_2C_5, (- - -) 3 μM QT_2C_5, (- - -) 4 μM QT_2C_5, (-.-.-) 5 μM QT_2C_5, (. - . -) 10 μM QT_2C_5, (-..-..) 25 μM QT_2C_5 **(F)** QT_2C_6 with 0.5 μg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 0.1 μM QT_2C_6, (. . . .) 1 μM QT_2C_6, (-----) 2 μM QT_2C_6, (- - -) 3 μM QT_2C_6, (- - -) 4 μM QT_2C_6, (-.-.-) 5 μM QT_2C_6, (. - . -) 10 μM QT_2C_6, (-..-..) 25 μM QT_2C_6, **(G)** QT_2C_7 with 0.5 μg/mL rhodamine 123 : (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 0.1 μM QT_2C_7, (. . . .) 1 μM QT_2C_7, (-----) 2 μM QT_2C_7, (- - -) 3 μM QT_2C_7, (- - -) 4 μM QT_2C_7, (-.-.-) 5 μM QT_2C_7, (. - . -) 10 μM QT_2C_7, (-..-..) 25 μM QT_2C_7, and **(H)** QT_2C_8 with 0.5 μg/mL rhodamine 123 : (—) DMSO, (**—**) 1 μM GF120918, (.....) 1 μM QT_2C_8, (. . . .) 5 μM QT_2C_8, (-----) 10 μM QT_2C_8, (- - -) 25 μM QT_2C_8, (- - -) 50 μM QT_2C_8, (-.-.-) 100 μM QT_2C_8, (. - . -) 150 μM QT_2C_8, (-..-..) 200 μM QT_2C_8

Figure S2

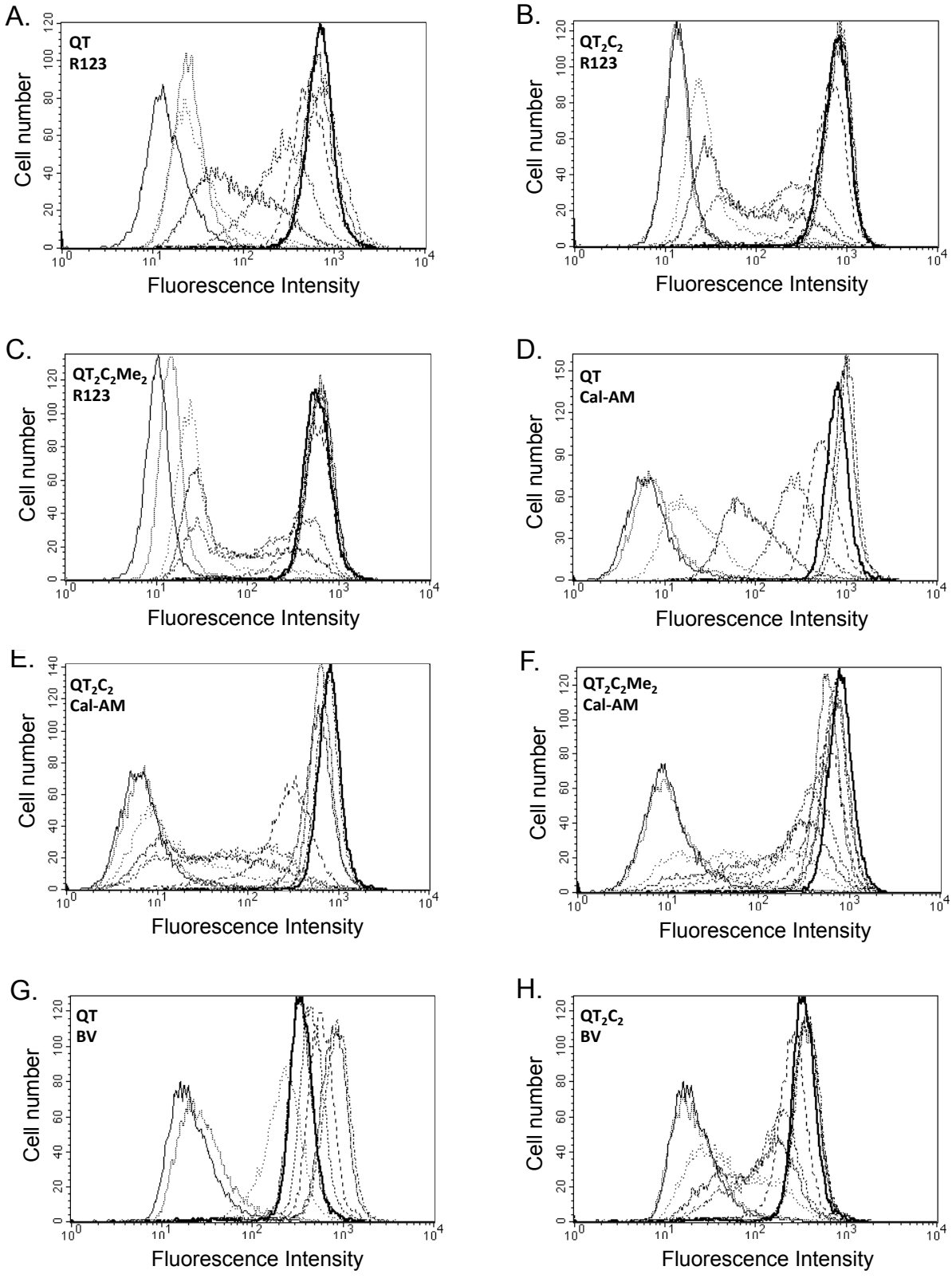
A.
QT
R123
B.
QT2C2
R123
C.
QT2C2Me2
R123
D.
QT
Cal-AM
E.
QT2C2
Cal-AM
F.
QT2C2Me2
Cal-AM
G.
QT
BV
H.
QT2C2
BV
Cell number
Fluorescence Intensity

Figure S2 continued

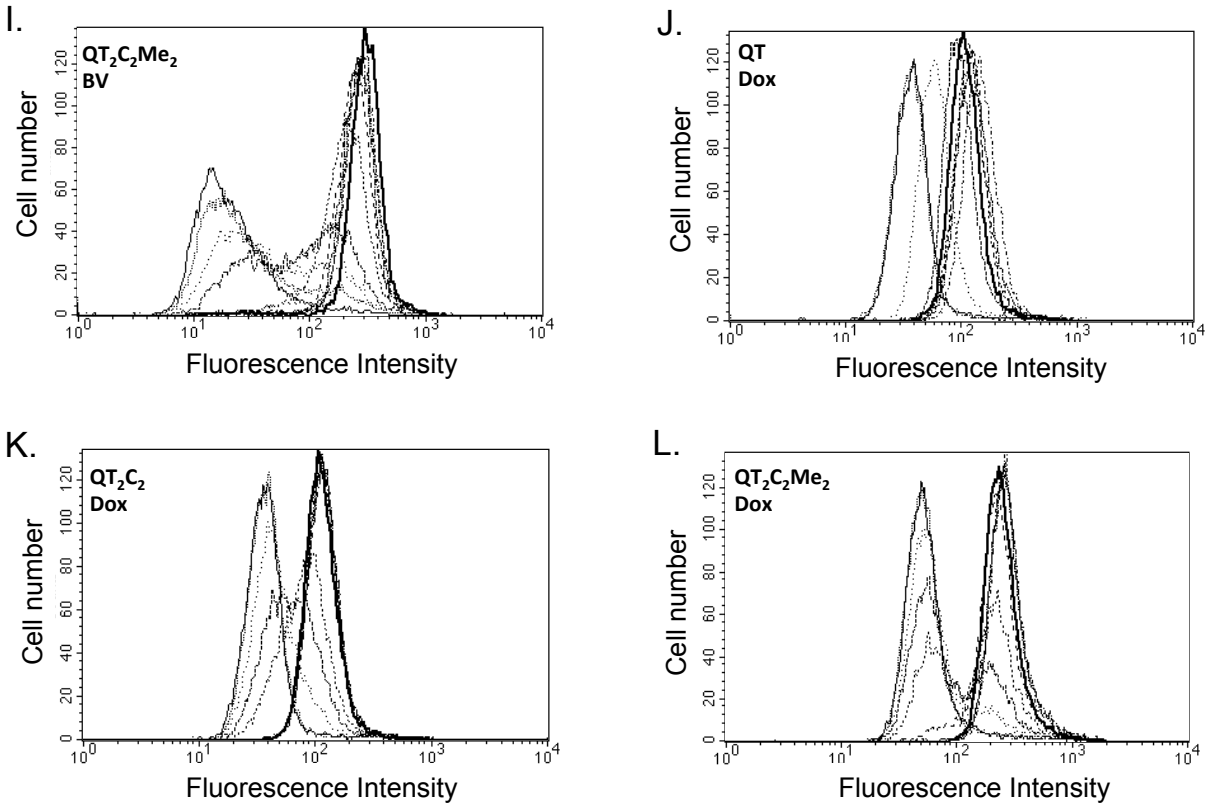

Figure S2: Dose response curves for MCF-7/DX1 cells treated with increasing concentrations of **(A)** QT with 0.5 µg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 10 µM QT, (. . . .) 25 µM QT, (-----) 50 µM QT, (- - -) 100 µM QT, (- - -) 200 µM QT, (-.-.-) 300 µM QT, (-..-..) 400 µM QT **(B)** QT_2C_2 with 0.5 µg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM QT_2C_2, (. . . .) 0.5 µM QT_2C_2, (-----) 0.75 µM QT_2C_2, (- - -) 1 µM QT_2C_2, (- - -) 2 µM QT_2C_2, (-.-.-) 3 µM QT_2C_2, (. - . -) 5 µM QT_2C_2, (-..-..) 10 µM QT_2C_2 **(C)** $QT_2C_2Me_2$ with 0.5 µg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.5 µM µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 0.75 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 1 µM µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 5 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 25 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 50 µM $QT_2C_2Me_2$ **(D)** QT with 0.5 µM calcein-AM : (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918 µM QT_2C_4, (.....) 1 µM QT, (. . . .) 10 µM QT, (-----) 25 µM QT, (- - -) 50 µM QT, (- - -) 100 µM QT, (-.-.-) 300 µM QT, (. - . -) 400 µM QT **(E)** QT_2C_2 with 0.5 µM calcein-AM: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM QT_2C_2, (. . . .) 0.5 µM QT_2C_2, (-----) 0.75 µM QT_2C_2, (- - -) 1 µM QT_2C_2, (- - -) 2 µM QT_2C_2, (-.-.-) 5 µM QT_2C_2, (. - . -) 10 µM QT_2C_2, (-..-..) 25 µM QT_2C_2 **(F)** $QT_2C_2Me_2$ with 0.5 µM calcein-AM: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 0.75 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 1 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 5 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 10 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 25 µM $QT_2C_2Me_2$, **(G)** QT with 0.5 µM BODIPY-FL-verapamil : (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 1 µM QT, (. . . .) 10 µM QT, (-----) 25 µM QT, (- - -) 50 µM QT, (- - -) 100 µM QT, (-.-.-) 300 µM QT, (. - . -) 400 µM QT **(H)** QT_2C_2 with 0.5 µM BODIPY-FL-verapamil : (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM QT_2C_2, (. . . .) 0.5 µM QT_2C_2, (-----) 0.75 µM QT_2C_2, (- - -) 1 µM QT_2C_2, (- - -) 2 µM QT_2C_2, (-.-.-) 5 µM QT_2C_2, (. - . -) 10 µM QT_2C_2, (-..-..) 25 µM QT_2C_2 **(I)** $QT_2C_2Me_2$ with 0.5 µM BODIPY-FL-verapamil: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.75 µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 1 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 3 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 5 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 10 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 25 µM $QT_2C_2Me_2$ **(J)** QT with 3 µM doxorubicin : (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 1 µM QT, (. . . .) 10 µM QT, (-----) 25 µM QT, (- - -) 50 µM QT, (- - -) 100 µM QT, (-.-.-) 300 µM QT, (. - . -) 400 µM QT **(K)** QT_2C_2 with 3 µM doxorubicin : (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM QT_2C_2, (. . . .) 0.5 µM QT_2C_2, (-----) 0.75 µM QT_2C_2, (- - -) 1 µM QT_2C_2, (- - -) 2 µM QT_2C_2, (-.-.-) 5 µM QT_2C_2, (. - . -) 25 µM QT_2C_2, (-..-..) 50 µM QT_2C_2 **(L)** $QT_2C_2Me_2$ with 3 µM doxorubicin: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 0.75 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 1 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 5 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 25 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 50 µM $QT_2C_2Me_2$

Figure S3

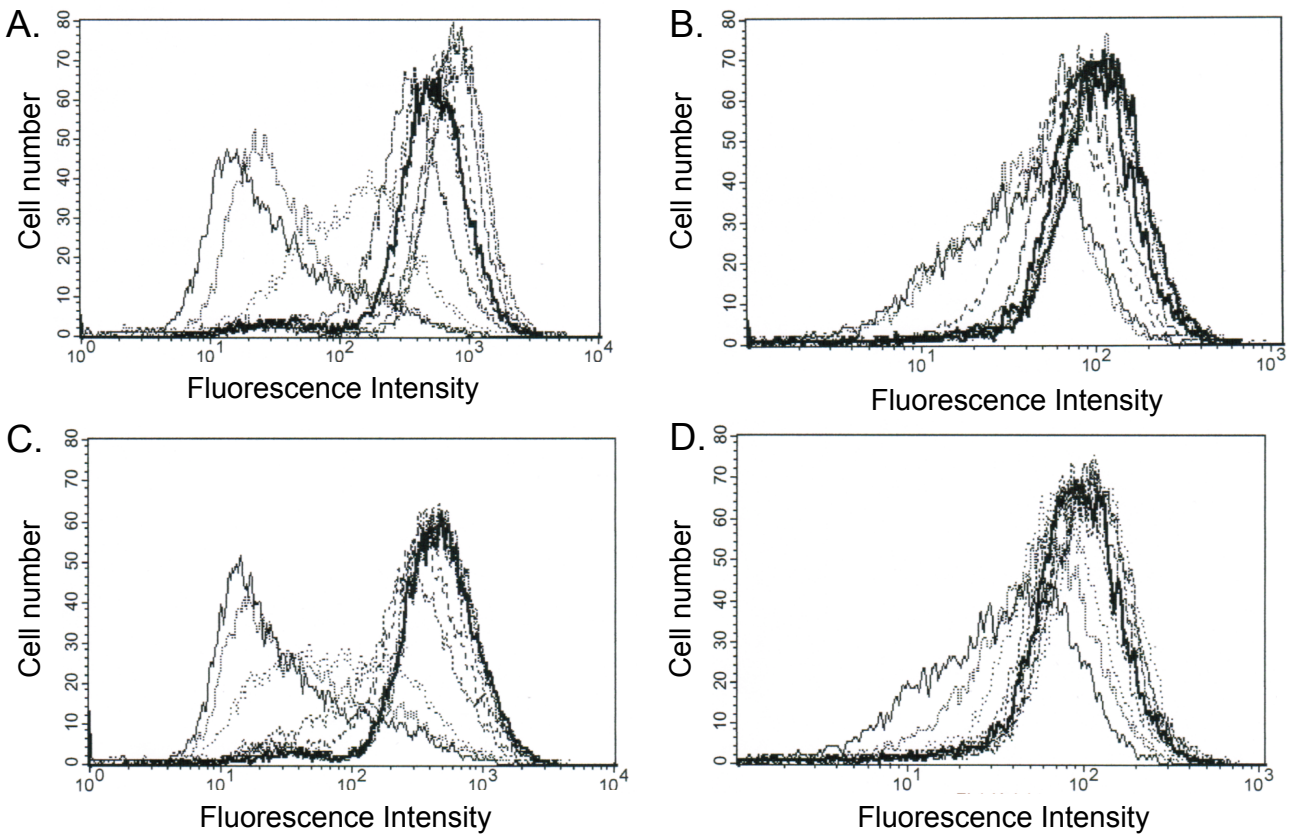

Figure S3: Dose response curves for hCMEC/D3 cells treated with increasing concentrations of (A) QT with 0.5 µg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 1 µM QT, (. . . .) 10 µM QT, (-----) 25 µM QT, (- - -) 50 µM QT, (- - -) 100 µM QT, (-.-.-) 200 µM QT, (. - . -) 300 µM QT, (-..-..) 400 µM QT; **(B)** QT with 0.5 µM calcein AM: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 1 µM QT, (. . . .) 5 µM QT, (-----) 10 µM QT, (- - -) 25 µM QT, (- - -) 50 µM QT, (-.-.-) 100 µM QT, (. - . -) 200 µM QT, (-..-..) 300 µM QT **(C)** $QT_2C_2Me_2$ with 0.5 µg/mL rhodamine 123: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.25 µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 0.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 0.75 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 3 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 7.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 10 µM $QT_2C_2Me_2$, and **(D)** $QT_2C_2Me_2$ with 0.5 µM calcein AM: (—) DMSO, (**—**) 1 µM GF120918, (.....) 0.1 µM $QT_2C_2Me_2$, (. . . .) 0.25 µM $QT_2C_2Me_2$, (-----) 0.4 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 0.5 µM $QT_2C_2Me_2$, (- - -) 1 µM $QT_2C_2Me_2$, (-.-.-) 2 µM $QT_2C_2Me_2$, (. - . -) 5 µM $QT_2C_2Me_2$, (-..-..) 10 µM $QT_2C_2Me_2$