UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Studium lékových interakcí antivirotik na střevních transportérech

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Zdeněk Záboj

Poděkování

Chtěl bych tímto poděkovat vedoucímu práce, PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho rady, připomínky, vstřícnost při konzultacích a čas, který mi věnoval. Dále chci poděkovat Mgr. Ondřeji Martincovi za cenné rady, pomoc a trpělivost v experimentální části diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorských dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 12. 5. 2019

Zdeněk Záboj

1. OBSAH

2. ABSTRAKT 6

3. ABSTRACT 7

4. ÚVOD 8

5. TEORETICKÁ ČÁST 10

5.1 HCV 10

5.1.1 Epidemiologie a průběh infekce HCV 10

5.1.2 Léčba chronické infekce HCV 11

5.2 Sofosbuvir 12

5.2.1 Charakteristika a mechanismus účinku 12

5.2.2 Farmakokinetika 14

5.2.3 Farmakokinetické lékové interakce a kontraindikace 15

5.3 Střevní bariéra 17

5.3.1 Intestinální efluxní ABC membránové transportéry 18

5.3.2 Modely střevní bariéry 21

6. HYPOTÉZA 24

7. CÍL PRÁCE 25

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 26

8.1 Chemikálie 26

8.2 Kultivace buněk 27

8.3 Obousměrný transport přes monovrstvu Caco-2 27

8.4 Měření transepitelární elektrické rezistence (TEER) 28

8.5 Průběh experimentu 28

8.6 Analytická část 29

8.7 Výpočet efluxního poměru 30

8.8 Zpracování dat a použité statistické modely 30

9. VÝSLEDKY 31

10. DISKUSE 39

11. ZÁVĚR 44

12. POUŽITÉ ZKRATKY 45

13. SEZNAM TABULEK 48

14. SEZNAM OBRÁZKŮ 49

15. SEZNAM GRAFŮ 50

16. POUŽITÁ LITERATURA 51

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Zdeněk Záboj

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium lékových interakcí antivirotik na střevních transportérech

Sofosbuvir je antivirotikum široce využívané v terapii chronické hepatitidy C. Toto orálně aplikované proléčivo je navrženým substrátem ATP-vázajících (ABC) efluxních transportérů, P-glykoproteinu (ABCB1) a breast cancer resistance proteinu (ABCG2). ABCB1 a ABCG2 jsou významnými determinanty střevní absorpce a jsou i místem vzniku významných farmakokinetických lékových interakcí, vedoucích ke změně expozice léčivu. Farmakokinetické lékové interakce mohou být nežádoucí (zvyšující toxicitu léčby), nebo naopak žádoucí (umožňující redukci dávkování). Protože je sofosbuvir často podáván v kombinačních režimech s jinými anti(retro)virotiky, bylo cílem předkládané diplomové práce studovat schopnost zvýšit střevní absorpci sofosbuviru. Pro studium farmakokinetických lékových interakcí na ABCB1 a ABCG2 byla využita široce etablovaná *in vitro* metoda obousměrného transportu přes polarizovanou monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2, která je odvozena od kolorektálního karcinomu. Analyzovali jsme lékové interakce sofosbuviru na těchto efluxních transportérech s vybranými anti(retro)virotiky. Jako pozitivní kontrola inhibice transportu byli použity specifické inhibitory Ko134 pro ABCG2, zosuquidar pro ABCB1 a elacridar jako inhibitor ABCB1 i ABCG2. Výsledky nám ukázaly v použité 5μM koncentraci sofosbuviru pouze inhibici ABCB1. Z použitých anti(retro)virotik prokázala signifikantní inhibiční potenciál (a tím i potenciál zvýšit střevní absorpci sofosbuviru *in vivo)* atazanavir, daclatasvir, ledipasvir, lopinavir, simeprevir a ritonavir, jakožto inhibitory ABCB1. Analýza dat několika zkoumaných koncentrací inhibitoru lopinaviru prokázala závislost míry inhibice na koncentraci. V diplomové práci jsme demonstrovali možnost využití interakcí léčiv na střevních efluxních transportérech jako možného aspektu vedoucího k redukci dávkování a tím k celkovému snížení ceny farmakoterapie.

3. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Zdeněk Záboj

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of drugs interactions of antiviral drugs with intestinal transporters

Sofosbuvir is an antiviral agent widely used in the treatment of chronic hepatitis C. This orally administered prodrug is a designed substrate of ATP-binding (ABC) efflux transporters, P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). ABCB1 and ABCG2 are important determinants of intestinal absorption and are the site of significant pharmacokinetic drug interactions, leading to changes in drug exposure. Pharmacokinetic drug interactions may be undesirable (increasing the toxicity of the treatment) or desirable (allowing dose reduction). Because sofosbuvir is often administered in combination regimens with other anti(retro)virotics, the aim of this thesis was to study the ability to enhance intestinal absorption of sofosbuvir. To study the pharmacokinetic drug interactions on ABCB1 and ABCG2, a widely established *in vitro* bi-directional transport method through a polarized monolayer formed by the Caco-2 cell line derived from colorectal cancer has been used. We analyzed the drug interactions of sofosbuvir on these efflux transporters with selected anti(retro)virotics. Specific Ko134 inhibitors for ABCG2, zosuquidar for ABCB1 and elacridar as both ABCB1 and ABCG2 inhibitors were used as positive transport inhibition controls. The results showed us only the inhibition of ABCB1 in the 5 μM concentration of sofosbuvir. From the used anti-virotics, atazanavir, daclatasvir, ledipasvir, lopinavir, simeprevir and ritonavir, as ABCB1 inhibitors, demonstrated significant inhibitory potential and thus the potential to increase the intestinal absorption of sofosbuvir *in vivo*. Analyzing the data of several research concentrations of inhibitor lopinavir demonstrated a concentration-dependent inhibition of lopinavir. In this thesis, we demonstrated the possibility of using drug interactions on intestinal efflux transporters as a possible aspect leading to dose reduction and thus an overall reduction in the cost of pharmacotherapy.

4. ÚVOD

Chronická infekce virem hepatitidy typu C je závažné onemocnění postihující celosvětově 80–160 milionů lidí (Zopf, Kremer, Neurath, & Siebler, 2016), každoročně umírá na HCV a její komplikace kolem 400 tisíc lidí (Dufour, 2005). V minulosti nebyla dostupná účinná léčba proti jejím mnoha genotypům. Terapeutická revoluce léčby HCV přišla v roce 2011 s nástupem přímo působících antivirotik (DAA) na trh. První generace představovala látky telaprevir a boceprevir. Obě tyto látky však byly limitovány zvyšováním nežádoucích účinků pegylovaného interferonu (Peg-IFN) a ribavirinu (RBV) se kterými byly podávány v kombinaci, a vykazovaly dostatečný účinek jen proti genotypu 1. Později se na trhu objevily látky s dobrou tolerancí a vysokou trvalou virologickou odpovědí, jako je sofosbuvir (Rivero-Juarez, Brieva, Frias, & Rivero, 2018).

Sofosbuvir je DAA s velkou účinností, s nízkým výskytem nežádoucích účinku a s nízkou náchylností ke vzniku rezistence (Bhatia, Singh, Grewal, & Natt, 2014). Zároveň je v současnosti asi nejúčinnějším léčivem proti HCV na trhu a má proti předchozím léčivům mnoho přínosů, jako např. perorální podání v jednodenním dávkovacím schématu (Prof. MUDr. Petr Urbánek, 2014; Rivero-Juarez et al., 2018). Perorální podání však pro většinu léčiv znamená absorpci skrz střevní bariéru (Artursson & Karlsson, 1991).

Střevní absorpce léčiv je však velice komplikovaným dějem, jehož se účastní široká škála faktorů. Mezi klinicky významné faktory patří rozsáhlá skupina střevních membránových proteinů (Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014), ke které patří i rodina ABC efluxních transportérů (Schinkel & Jonker, 2012). Ke klinicky důležitým střevním ABC transportérů patří P-glykoprotein (P-gp, ABCB1) a breast cancer resistence protein (BCRP, ABCG2). (Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014), které snižují absorpci svých substrátů; sofosbuvir je substrátem ABCG2 a ABCB1 (Squibb, 2013).

Klinické působení léčiva v organismu je významnou měrou ovlivněno farmakokinetickými lékovými interakcemi na střevních transportérech ABCB1 a ABCG2 (Montanari & Ecker, 2015) vedoucími ke zvýšení expozice léčivu vlivem současně podaného léčiva (Holý & Pešková, 2015) na těchto transportérech. Z toho vyplývá nutnost výzkumu těchto lékových interakcí pro zabezpečení bezpečné a dostatečně

účinné farmakoterapie. Metodou doporučenou EMA (European Medicines Agency), FDA (Food and Drug Administration) a ITC (International Transporter Concortium) je pro tento výzkum *in vitro* testování obousměrného transportu na buňkách Caco-2 (Huang, 2009; Anna & Huguet Ninou, 2013; Giacomini et al., 2010; Liu et al., 2017).

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 HCV

5.1.1 Epidemiologie a průběh infekce HCV

Hepatitida C je infekční onemocnění způsobené virem hepatitidy typu C (HCV) postihující především játra. HCV je jednovláknový RNA virus rodu Hepacivirus z čeledi *Flaviviridae*. Jeho čtecí rámec kóduje 10 strukturálních proteinů (pro kapsidu a obal) a další nestrukturální proteiny nutné k replikaci viru, včetně NS5B (Bhatia et al., 2014). Je známo jeho 6 genotypů a okolo 100 subtypů. Celosvětově (včetně ČR) je nejčastějším subtypem 1b (Husa, 2009). Hepatitida C mívá akutní, několik týdnů trvající průběh se spontánní clearance. Akutní infekce, projevující se nechutenstvím, vágními břišními potížemi, nauzeou a zvracením, přechází do chronického stavu v 60–85 % případů (Lexová, Částková, Kynčl, Manďáková, & Němeček, 2015).

Inkubační doba se pohybuje v rozsahu 2 týdnů až 6 měsíců, nejčastější je 6–9 týdnů. HCV se přenáší parenterálně nakaženou krví, dále také sexuálním stykem či vertikálně z matky na dítě během těhotenství (Dufour, 2005). Chronická infekce virem hepatitidy C postihuje 80–160 milionů lidí po celém světě a až u 30 % postižených vyústí v cirhózu jater. U těchto pacientů se vyvíjí hepatocelulární karcinom (Zopf et al., 2016). Ročně zemře na komplikace HCV infekce až 400 tisíc lidí (Dufour, 2005). V roce 2001 bylo zjištěno, že prevalence protilátek anti-HCV v běžné české populaci je 0,2 % (P Urbánek et al., 2017). Infekce virem HCV se ale v české populaci vyskytuje převážně v určitých rizikových skupinách, které nelze plně zmapovat. Je tedy pravděpodobné, že skutečná prevalence bude vyšší. Mezi nejrizikovější skupinu patří injekční uživatelé drog. V letech 2006–2015 bylo nahlášeno 1254 případů akutních HCV a 7577 případů chronické HCV. Injekční uživatelé drog tvoří 88,5 % osob s akutní formou HCV a 93 % osob s chronickou hepatitidou C (Lexová et al., 2015).

U lidí s akutní symptomatickou formou se objevuje horečka, únava, snížená chuť k jídlu, nevolnost, zvracení, bolest břicha, tmavá moč, šedě zbarvená stolice, bolest kloubů a žloutenka (žloutnutí kůže a bělma očí). Kvůli častému asymptomatickému průběhu (až v 80 %) často nedojde ke včasnému záchytu mnoha infikovaných osob, což vede k tomu, že diagnóza HCV může proběhnout až poté, co jsou vážně poškozena játra (Dufour, 2005).

Infekce HCV je často doprovázena koinfekcí HIV (Herbst & Reddy, 2013). Proto se v diplomové práci zabývám také některými antiretrovirotiky používanými při léčbě HIV (ritonavir, didanosin, atazanavir, zidovudin, lopinavir).

5.1.2 Léčba chronické infekce HCV

Léčba chronické infekce HCV záleží na několika faktorech, mezi které se řadí věk pacienta, genotyp viru a míra poškození jater. V současnosti dostupná léčiva umožňují určitou míru individualizace léčby.

Do roku 2011 byla pro léčbu HCV jako standard brána kombinace pegylovaného interferonu s ribavirinem (Peg-IFN; RBV). Tato terapie byla ale spojena s velkou mírou nežádoucích účinků a suboptimální mírou trvalé virologické odpovědi. V roce 2011 však vstoupila na trh přímo působící antivirotika (DAA), která znamenala revoluci v léčbě HCV. V první generaci byly na trh uvedena léčiva telaprevir a boceprevir, což jsou dva inhibitory proteázy NS3/4a. Oba byly používány v kombinaci s Peg-IFN a RBV po dobu 24-48 týdnů a jsou registrovány pouze pro léčbu HCV genotypu 1. U ostatních genotypů neměly dostatečný účinek. Jejich největším problémem však byl významný výskyt nežádoucích účinků (kožní vyrážky, pruritus, anemie, dysgeuzie). Později došlo k začlenění účinnějších DAA s velice dobrou tolerancí a vysokou trvalou virologickou odpovědí (až do 100 %) jako jsou sofosbuvir a daclatasvir (Rivero-Juarez et al., 2018).

Další léčiva používaná v terapii HCV jsou ledipasvir, velpatasvir, dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir, grazoprevir, elbasvir, simeprevir, voxilaprevir. Sofosbuvir je používán samostatně (přípravek Sovaldi) nebo ve fixní kombinaci s ledipasvirem (přípravek Harvoni), s velpatasvirem (přípravek Epclusa), s velpatasvirem a voxilaprevirem (přípravek Vosevi) (P Urbánek et al., 2017).

Tabulka 1: V současnosti využívané kombinace anti-HCV farmakoterapeutik dle genotypu HCV.

HCV - genotyp							
DAA - režim	**1a**	**1b**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
SOF + R	(x)	(x)	x	x	(x)	(x)	(x)
SOF + SMV (R)	x	x			x		
SOF + DCV[1] (R)	x	x	(x)	x	x		
SOF + LDV (R)	x	x		(x)	x	x	x
OBV + PTV/r (DSV; R) (3D)	x	x					
OBV + PTV/r (R) (2D)					x		

DAA – přímé antivirotika, DCV – daclatasvir, DSV – dasabuvir, HCV - virus hepatitidy typu C, LDV – ledipasvir, OBV – ombitasvir, PTV – paritaprevir, SMV – simeprevir SOF – sofosbuvir, R – ribavirin, r – ritonavir, x – dostatečná trvalá virologická odpověď, (x) – nekonzistentní nebo nedostatečná data, [1] – neschválen v USA

Převzato a upraveno z: (Zopf et al., 2016)

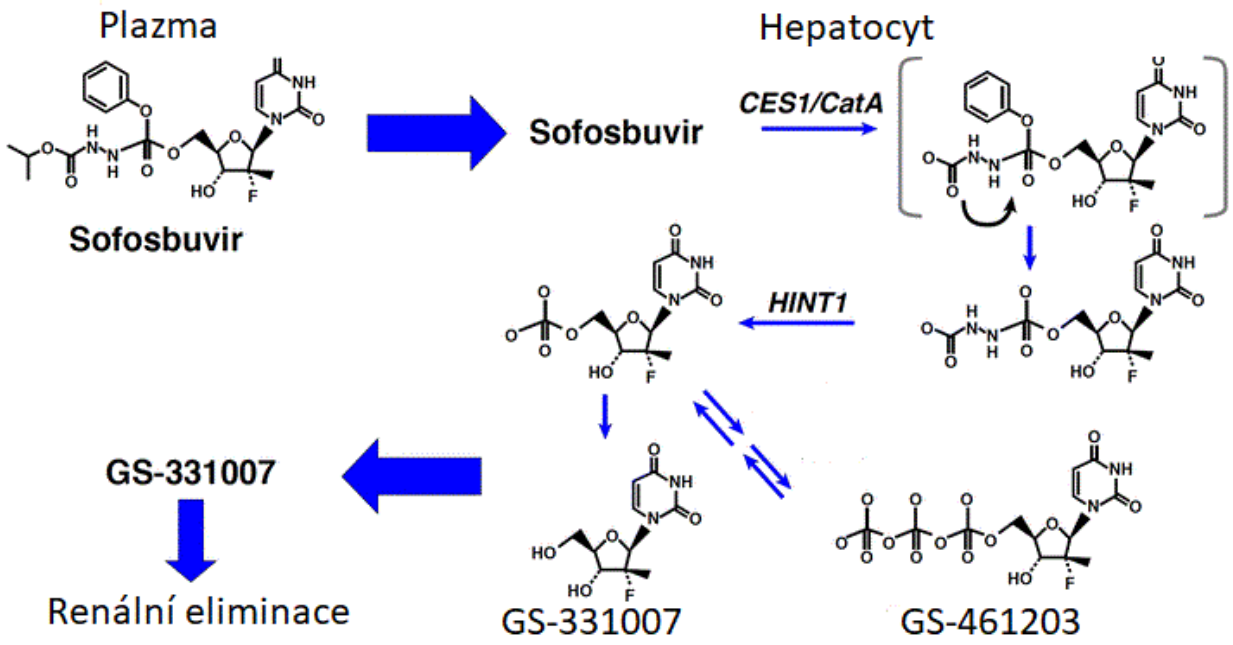
5.2 Sofosbuvir

Sofosbuvir je pravděpodobně nejúčinnější přípravek proti HCV na trhu. Jedná se o vysoce účinné, bezpečné, perorálně podávané léčivo s nízkou náchylnost ke vzniku rezistence (Bhatia et al., 2014). Proti starším lékům má několik výhodných vlastností, jako např zkrácení léčby, dávkovací interval jednou denně p.o., nízká toxicita a možnost nekombinovat jej s Peg-IFN (Rivero-Juarez et al., 2018).

5.2.1 Charakteristika a mechanismus účinku

Sofosbuvir, nukleotidový NS5B inhibitor, chemický název L-Alanine, N-[[P(S),2'R]-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-methyl-P-phenyl-5'-uridylyl]-1-methylethyl ester) je syntetický inhibitor (analog uridinu) virové RNA-dependentní RNA polymerázy (produkt NS5B oblasti virového genomu) (Bhatia et al., 2014). Používá se pro léčbu HCV samostatně nebo v kombinaci s jinými DAA včetně jiných NS5B inhibitorů, či s Peg-IFN a RBV (Rivero-Juarez et al., 2018). Je účinný proti všem genotypům HCV. Hodnoty EC_{50} jsou u genotypů 1a – 0,04 µmol; 1b – 0,11 µmol; 2a – 0,05 µmol; 3a – 0,05 µmol; 4a – 0,04 µmol. Pro chimerické genotypy 1b kódující polymerázu 2b, 5a a 6a jsou nutné vyšší koncentrace 0,14–0,15 µmol (SÚKL, 2018).

Monoterapie terapie sofosbuvirem je všeobecně dobře tolerována, mezi frekventované nežádoucí účinky patří pouze únava a nevolnost. Vyskytly se však i případy nežádoucích účinků jako bolest hlavy, nespavost, závratě, svědění, infekce horních cest dýchacích, vyrážka, bolest zad, anémie 1. stupně a lymfopenie 4. stupně (Gane et al., 2013; Herbst & Reddy, 2013; Bhatia et al., 2014). Mezi nejčastější nežádoucí účinky kombinace sofosbuvir/RBV patřila ve více než 20 % případů únava a bolest hlavy, při kombinaci navíc s Peg-IFN také nespavost, nauzea a anemie (FDA, 2013). Klinické testování dále ukázalo, že vyšší dávky sofosbuviru (až 1200 mg v jedné dávce) nevedou ke zvýšení četnosti ani závažnosti nežádoucích účinků sofosbuviru při porovnání s nežádoucími účinky standartní (400 mg) dávky (Squibb, 2013). Sofosbuvir také vykazuje vysokou míru adherence k léčbě, kdy i v kombinovaných režimech dosahuje adherence 95,9–100 % (Parekh et al., 2016). V případě injekčních uživatelů drog je medián adherence k terapii nižší (94 %), zde hraje největší roli nedodržování dávkovacího intervalu vlivem požití drogy (Cunningham et al., 2018).



Obrázek 1: Aktivace a inaktivace sofosbuviru

CES1—karboxylesteráza 1; CatA – katapsin A; HINT1 – Histidin triad nucleotide-binding protein; GS-331007 a GS-461203 – metabolity sofosbuviru
Převzato a upraveno z: (Kattakuzhy, Levy, & Kottilil, 2015)

Sofosbuvir je fosforamidátové proléčivo (monofosfát), které je aktivováno již při prvním průchodu játry hydrolytickým štěpením karboxylesterové skupiny, katalyzovanou lidským katepsinem A (CatA) nebo karboxylesterázou 1 (CES1), a štěpením fosforamidátu proteinem histidin triad nucleotide-binding protein (HINT1). V intracelulárním prostředí je poté trifosforylován za vzniku aktivního metabolitu (GS-461203) a následně pomocí NS5B inkorporováno do HCV RNA jako falešný nukleosid, kde tak dochází k terminaci syntézy HCV RNA (Urbánek et al., 2017; Bhatia et al., 2014; Herbst & Reddy, 2013; Cada, Cong, & Baker, 2014; Kattakuzhy, Levy, & Kottilil, 2015).

Nízká orgánová toxicita sofosbuviru je dána tím, že enzymy nutné k aktivaci sofosbuviru se nacházejí převážně v lidských játrech, tedy v místě jeho působení. GS-461203 také neinterferuje se syntézou lidské DNA a RNA (ani neinhibuje mitochondriální RNA polymerázy), což je také důvodem jeho bezpečnostního profilu (Petr Urbánek, 2014). Nevratná defosforylace GS-461203 poté vede ke vzniku neaktivního metabolitu GS-331007 (Rivero-Juarez et al., 2018). Metabolit GS-331007 představuje 90 % systémové expozice, výchozí molekula sofosbuviru pak 4 % (SÚKL, 2018). *In vitro* bylo zjištěno, že účinnost sofosbuviru je u všech genotypů HCV velice podobná (Lawitz et al., 2013). Možnost podávat sofosbuvir v režimech bez Peg-IFN představuje obrovskou naději pro pacienty s nejpokročilejší formou nemoci, stavem před transplantací jater. Pro tuto indikaci je schválená kombinace sofosbuvir/ribavirin.

5.2.2 Farmakokinetika

Sofosbuvir, na rozdíl od virostatik nižších generací, není metabolizován systémem cytochromu P-450, potenciál lékových interakcí je tedy výrazně menší. Sofosbuvir je však, na rozdíl od svého aktivního metabolitu GS-461203, substrátem lékového transportéru ABCB1 a ABCG2 (Petr Urbánek, 2014; Squibb, 2013; B. J. Kirby, Symonds, Kearney, & Mathias, 2015). Po perorálním podání je sofosbuvir rychle absorbován. Při standardní dávce 400 mg je dosaženo maximální koncentrace do jedné hodiny od podání. Maximální plazmatické koncentrace neaktivního metabolitu GS-331007 je pak dosaženo za tři hodiny. Absorpce není ovlivněna potravou. Vazba na plazmatické bílkoviny dosahuje u sofosbuviru 61-65 % (Rivero-Juarez et al., 2018; Kattakuzhy et al.,

2015; Rodriguez-Torres et al., 2013). V rozmezí 1 μg/ml až 20 μg/ml vazba nezávisí na koncentraci léku (Fda, 2013). Eliminace probíhá hlavně v podobě GS-331007, z 80 % ledvinami, ze 14 % stolicí (Rivero-Juarez et al., 2018) a z 2,5 % vydechovaným vzduchem. 3,5 % podané dávky je vylučováno ledvinami v nezměněném stavu. Medián eliminačního poločasu pro sofosbuvir je 0,4 hodiny a pro GS331007 27 hodin (SÚKL, 2018). Farmakokinetika není ovlivněna věkem (bráno pro věkovou skupinu 18–82 let), rasou ani pohlavím. Při podávání sofosbuviru po dobu 7 dní u pacientů se středně těžkou a těžkou poruchou funkce jater dochází ke zvýšení AUC (plocha pod křivkou) aktivního metabolitu o 126 % a o 143 % ve srovnání s pacienty bez jaterní dysfunkce. Není však vyžadována úprava dávkování. U lehké a středně těžké poruchy funkce ledvin není vyžadována úprava dávkování, u pacientů s těžkou poruchou (s glomerulární filtrací pod 30 ml/min.) se však podání sofosbuvir nedoporučuje. Hodnoty AUC_{0-24} v ustáleném stavu u pacientů s HCV infekcí pro sofosbuvir jsou 1010 ng*h/ml, pro GS331007 pak 7200 ng*h/ml. Vztaženo k hodnotám naměřených u zdravých jedinců byly hodnoty AUC_{0-24} u jedinců infikovaných HCV o 57 % vyšší u sofosbuviru, a o 39 % nižší u GS331007 (Squibb, 2013; Rivero-Juarez et al., 2018). U pediatrické populace ve věku 12–18 let bylo ve studiích ve 2. a 3. fázi klinického testování zjištěno, že expozice sofosbuviru a GS331007 je podobná dospělé populaci (Squibb, 2013).

5.2.3 Farmakokinetické lékové interakce a kontraindikace

Farmakokinetické lékové interakce zvyšují účinnost (nebo toxicitu) nebo snižují účinnost léčby změnou dispozice léčiva, nejčastěji vlivem jiného léčiva či látky (Holý & Pešková, 2015). Vzhledem k tomu, že riziko lékových interakcí stoupá v přímé úměře s množstvím léčiv, je mnoho starších pacientů (často polymorbidních) těmto interakcím vystaveno (Montanari & Ecker, 2015). Z hlediska hlavních determinant působení léčiva v organismu jsou kromě interakcí na jaterních enzymech patřících do rodiny cytochromu P450 důležité i lékové interakce na lékových transportérech lokalizovaných v biologických bariérách typu tenké střevo, ledviny a játra. Bylo zjištěno, že inhibice a indukce lékových transportérů výrazně ovlivňuje eflux a uptake xenobiotik, a tím klinické působení léčiva v organismu (Garrison, German, Mogalian, & Mathias, 2018; Müller & Fromm, 2011; Talavera Pons et al., 2017; Keogh, 2012; Schinkel & Jonker, 2012; FDA, 2017; Lumen et al., 2013).

U sofosbuviru bylo zjištěno, že z hlediska lékových interakcí pro něj platí, že induktory ABCB1 (jako rifampicin, rifabutin, rifapentin, karbamazepin, fenytoin, fenobarbital, modafinil, oxkarbazepin nebo přípravky obsahující *Hypericum perforatum*) snižují střevní absorpci sofosbuviru, čímž snižují plazmatickou i intracelulární koncentraci aktivního metabolitu a celkovou antivirovou účinnost. Současné podávání sofosbuviru a inhibitorů ABCG2/ABCB1 (jako cyclosporin A, paritaprevir, dasabuvir, ritonavir), vedlo ke zvýšení AUC a C_{max} sofosbuviru, zatímco hladiny GS-331007 zůstaly nezměněny (Squibb, 2013; Garrison, German, Mogalian, & Mathias, 2018; King et al., 2016; Talavera Pons et al., 2017). Sofosbuvir podaný ve fixní kombinaci s ledipasvirem zvyšuje toxicitu amiodaronu a hrozí riziko závažné bradykardie a srdeční blokády. Zvýšené riziko symptomatické bradykardie je také u pacientů užívajících současně se sofosbuvirem beta-blokátory (FDA, 2013; SÚKL, 2018). U kombinace sofosbuvir-ledipasvir bylo zjištěno zvýšení AUC sofosbuviru 2,16x. V minulosti klinicky testována terapeutická kombinace sofosbuvir (400 mg) + simeprevir (150 mg) + ledipasvir (90 mg) pak ukázala, že tato trojkombinace zvyšuje C_{max} simepreviru 2,3x a AUC 3,1x. U ledipasviru pak bylo zvyšení 1,6x pro C_{max} a 1,7x pro AUC. Literatura pak uvádí zvýšení AUC sofosboviru v kombinaci se simeprevirem 3,16x a zvyšení C_{max} 1,91x (Ouwerkerk-Mahadevan, Snoeys, Peeters, Beumont-Mauviel, & Simion, 2016; Bourgeois et al., 2017). Kombinace sofosbuvir + atazanavir (potenciovaný ritonavirem, emtricitabinem a tenofovirem DF) zvýšuje C_{max} sofosbuviru (o 109 %) a AUC (o 342 %) v porovnání s aplikací sofosbuviru bez inhibitoru (Rodriguez-Torres et al., 2015). Řada pacientů trpí kromě HCV také HIV, či je u nich už nutná transplantace jater. Prvotní studie se proto zaměřily i na léčiva, u kterých je pravděpodobné, že budou podávána spolu se sofosbuvirem. V těchto studiích ale nebyly zjištěny klinicky významné lékové interakce, vyžadující změnu dávkování u těchto léčiv: cyclosporin A, tacrolimus, metadon, efavirenz, rilpivirine, darunavir, ritonavir, raltegravir, tenofovir disoproxil fumarát, daclatasvir, emtriticabin, orální kontraceptiva (např. norgestimát/ethinylestradiol) a radalbuvir (Bhatia et al., 2014; Kirby & Mathias, 2012; Denning et al., 2011; Mathias, 2012).

Kvůli možnosti ovlivnění jaterních funkcí se doporučuje u pacientů užívajících antagonisty vitamínu K a současně i sofosbuvir sledovat hodnoty INR. Studie reprodukční toxicity u zvířat nenaznačují, že by terapie sofosbuvirem v těhotenství měla přímé či nepřímé škodlivé účinky. Z preventivních důvodu se však podání nedoporučuje. U zvířat byl prokázán přestup sofosbuviru a jeho metabolitů do mateřského mléka, proto by se sofosbuvir při kojení neměl používat (SÚKL, 2018).

5.3 Střevní bariéra

Střevní bariéra tvoří vícevrstvou komplexní bariéru mezi vnějším prostředním střevního lumen a vnitřním prostředím těla. Mezi její základní funkce patří zabránění vstupu patogenních mikroorganismů a toxických látek z lumen střeva, při současné absorpci a regulaci absorpce vody, elektrolytů a živin do oběhu (Fukui, 2016). Kromě fyzické bariéry, tvořené cévním endotelem, vrstvou epiteliálních buněk (enterocytů) spojených těsnými spoji (tight junctions) a mukózní vrstvou (Bischoff et al., 2014), ji tvoří také vnitřní imunologická bariéra. Střevní bariéra zaujímá povrch přibližně 400 m^2 a spotřebovává přibližně 40 % energetických výdajů lidského těla. Důležitým parametrem je střevní permeabilita, kterou lze kvantifikovat pomocí analýzy měření rychlosti toku inertních molekul (Fukui, 2016).

Transport léčiv přes střevní bariéru je dynamický proces, zahrnující několik možných způsobů přestupu, mezi které patří transcelulární transport přes buněčnou membránu enterocytu uskutečňovaný pasivní difuzí, facilitovanou difuzí, aktivním transportem, nebo transcytózou. Transyctóza je děj vyznačující se vysokou mírou receptorové specificity. Pro vstřebávání ho využívá řada látek (jako vitamín B12, imunoglobulin G, železo, ve vodě rozpustná antibiotika, peptidy a léčiva na bázi proteinů). Další možností je paracelulární přestup přes tight junctions (Balimane & Chong, 2005; Russell-Jones, 2002).

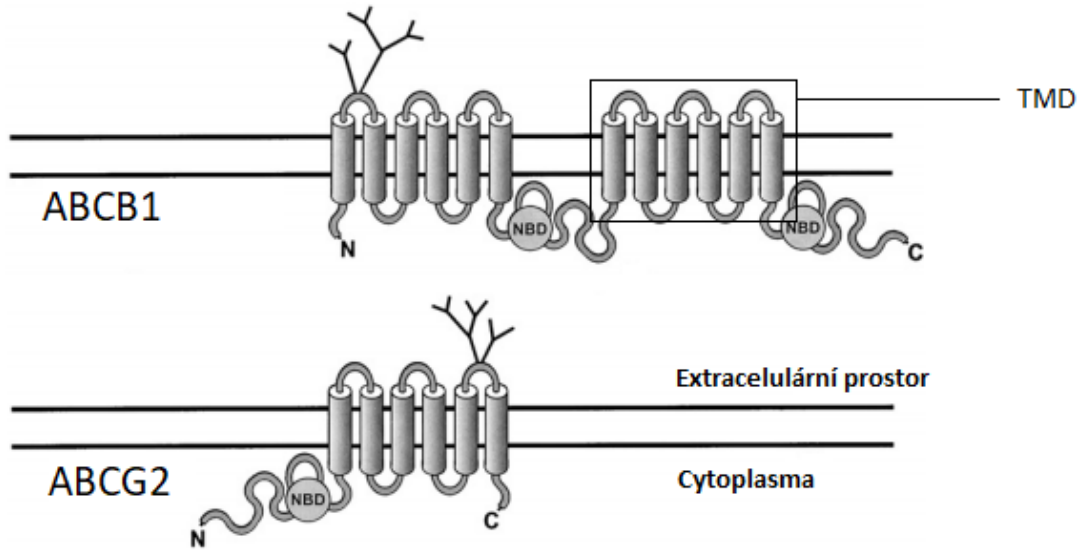
Téměř všechna perorálně podaná léčiva přechází přes střevní bariéru pomocí pasivní difúze. Některá léčiva však využívají i transport skrz paracelulární cesty (např. atenolol, famotidin, nadolol a ranitidin). Průměrná velikost pórů v lidském jejunu je 0,8 nm, u tlustého střeva je pak odpovídající hodnota 0,3 nm (Artursson & Karlsson, 1991;

DiMarco, Hunt, Dewi, & Heilshorn, 2017). Transport skrz paracelulární cesty je však díky tight junctions ve zdravém střevě minimální (Hillgren, Kato, & Borchardt, 1995).

5.3.1 Intestinální efluxní ABC membránové transportéry

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují absorpci perorálně podaných léčiv. Mezi klinicky významné faktory patří střevní efluxní ATP-vázající (ABC) transportéry, zejména pak ABCB1 a ABCG2. Jedná se o membránové proteiny, které snižují střevní absorpci svých substrátů (Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014; Schinkel & Jonker, 2012).

ABC transportéry využívají energii uvolněnou hydrolýzou ATP k přesunu substrátu přes plazmatické membrány i proti jejich elektrochemickému gradientu, aktivně přenášejí látky přes membrány za spotřeby (ATP binding cassette – ABC). Jedná se o proteiny, které ovlivňují absorpci, distribuci i exkreci léčiv. Jednotka základního ABC transportéru se skládá ze 4 domén; dvě domény NBD (nukleotid vázající domény) a dvě TMD (transmembránové domény). Jednotky NBD společně váží a hydrolyzují ATP, jednotky TMD se podílejí na rozpoznání substrátu a jeho translokaci přes buněčnou membránu. Tyto čtyři domény mohou být přítomny v rámci jednoho polypeptidového řetězce (kompletní transportér), nebo v rámci dvou oddělených proteinů (poloviční transportéry). Mechanismus transportu je vysvětlován konformačními změnami na TMD po navázání ATP na NBD, kdy se kapsa s navázaným substrátem přetočí z vnitřní na vnější stranu buňky. Následná hydrolýza ATP vede k uvedení TMD do výchozí pozice. ABC transportéry přenášejí širokou škálu substrátů přes extracelulární i intracelulární membrány, včetně mnoha metabolických produktů, lipidů, sterolů, anorganických iontů, iontů kovů, peptidů, cukrů a léčiv. Nejvýznamnějšími představiteli intestinálních ABC transportérů jsou ABCB1 a ABCG2 lokalizované v apikální (luminální) membráně enterocytů, kde efluxním mechanismem z enterocytu zpět do lumen střeva snižují absorpci svých substrátů (Keogh, 2012; Schinkel & Jonker, 2012; Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014; Vasiliou, Vasiliou, & Nebert, 2009; Ward et al., 2013).



Obrázek 2: Předpokládané sekundární struktury efluxních ABC transportérů.

TMD – transmembránová doména (každá je složená z 6 transmembránových segmentů); NBD – nukleotid vázající doména; N–konec řetězce zakončený aminovou funkční skupinou; C–konec řetězce zakončený karboxylovou funkční skupinou. Převzato a upraveno z: (Schinkel & Jonker, 2012)

Membránové transportéry představují jedny z hlavních determinant farmakokinetiky (kromě absorpce ovlivňují také distribuci a exkreci) a tak úzce souvisí s účinností a bezpečnostním profilem léčiv. Mezinárodní transportérové konsorcium proto doporučuje testovat interakce ABCB1 a ABCG2 s nově vyvíjenými léčivy a kvantifikovat lékové interakce na těchto proteinech při zavádění nových kombinačních režimů léčiv již zavedených na trh.

5.3.1.1 P-glykoprotein (P-gp, ABCB1)

ABCB1 je protein přibližné velikosti 170 kDa. ABCB1 je efluxní transportér exprimovaný v mnoha tkáních, kdy je nejvíce zastoupený v enterocytech, ale také v hematoencefalické, placentární a hematotestikulární bariéře, játrech a ledvinách. V GIT exprese ABCB1 stoupá v proximálně distálním směru, kdy je pak nejvyšší v tlustém střevě (Dietrich, Geier, & Oude Elferink, 2003).

Poprvé byl popsán jako efluxní transportér na buňkách vaječníků čínských křečků roku 1976 dvojicí R. L. Juliano a V. Ling (Juliano & Ling, 1976; Vasiliou et al., 2009).

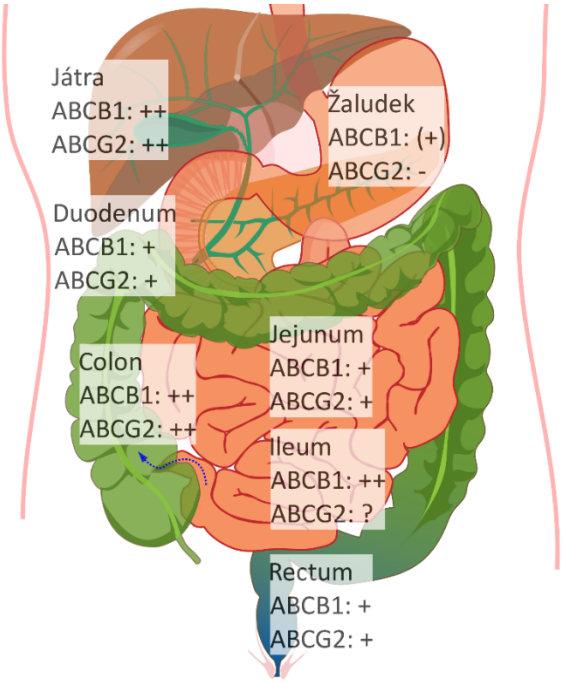
K prvnímu popisu u člověka došlo u nádorových buněk, kde jeho zvýšená exprese způsobovala rezistenci k protinádorové léčbě. Kromě mnoha cytostatik patří mezi jeho substráty řada dalších léčiv z různých terapeutických skupin (př. kolchicin, loperamid, saquinavir, sofosbuvir, cimetidin, methotrexát, morfin, domperidon, verapamil, digoxin, dexamethason a další). Všechny molekuly, jež jsou substrátem ABCB1, jsou organické molekuly o velikost od 200 Da do 1900 Da, často obsahující aromatické skupiny. Většina účinně přenášených substrátů je bez náboje či jen slabě bazické, vždy se však jedná o amfifilní nebo hydrofobní látky. Substrátová rozmanitost je pak důvodem, že současně podaná léčiva mezi sebou mohou kompetovat o vazebné místo, a tak být místem vzniku lékových interakcí (Schinkel & Jonker, 2012; Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014). Sofosbuvir a GS-331007 nejsou inhibitorem ABCB1 (Squibb, 2013).

5.3.1.2 Breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)

ABCG2, protein o velikost 72 kDa (Mao & Unadkat, 2005), byl poprvé objeven v buňkách rakoviny prsu. Stejně jako ABCB1 je ABCG2 exprimována na apikální membráně enterocytů, kde snižuje absorpci mnoha perorálně podaných molekul. ABCG2 je exprimován v mnoha tkáních např: tenké a tlusté střevo (apikální membrána enterocytů), kanikulární membrána hepatocytu, syncytiotrofoblasty placenty, endotelové buňky žilní a kapilární sítě, prsní tkáň, hematoencefalická a hematotestikulární bariéra, ledviny.

ABCG2 se skládá z jedné podjednotky NBD a jedné TMD o šesti segmentech, díky čemuž je označován jako poloviční transportér. Je lokalizovaný na apikální straně polarizovaných buněk. Díky velkému tkáňovému překryvu exprese ABCG2 a ABCB1 je možné, že mají oba tyto transportéry podobný dopad na absorpci a biologickou dostupnost svých substrátů (Dietrich et al., 2003; Schinkel & Jonker, 2012; Bugde et al., 2017). Jeho substráty jsou hydrofobní sloučeniny, amfifilní, ale i pozitivně nebo negativně nabité, ve vodě rozpustné molekuly (Sarkadi, Homolya, Szakács, & Váradi, 2006). Mezi jeho substráty patří mnoho antibioticky, cytotoxicky a antiviroticky působících léčiv, mimo jiné také lopinavir, zidovudin, daunorubicin, etoposide, mitoxantron (rezistence buněk exprimující ABCG2 vůči mitoxantronu mu dala také jedno z jeho jmen MXR – mitoxantron resistance associated gene), topocetan, doxorubicin,

sofosbuvir, methotrexát. Mezi inhibitory patří Ko134 (specifický inhibitor ABCG2), fumitremorgin C (Bugde et al., 2017). Sofosbuvir ani GS-331007 nejsou inhibitorem ABCG2 (Squibb, 2013).



Obrázek 3: Exprese ABCB1 a ABCG2 v různých částech GIT

Převzato a upraveno z: (Dietrich et al., 2003; Ruiz Mariana, 2008)

5.3.2 Modely střevní bariéry

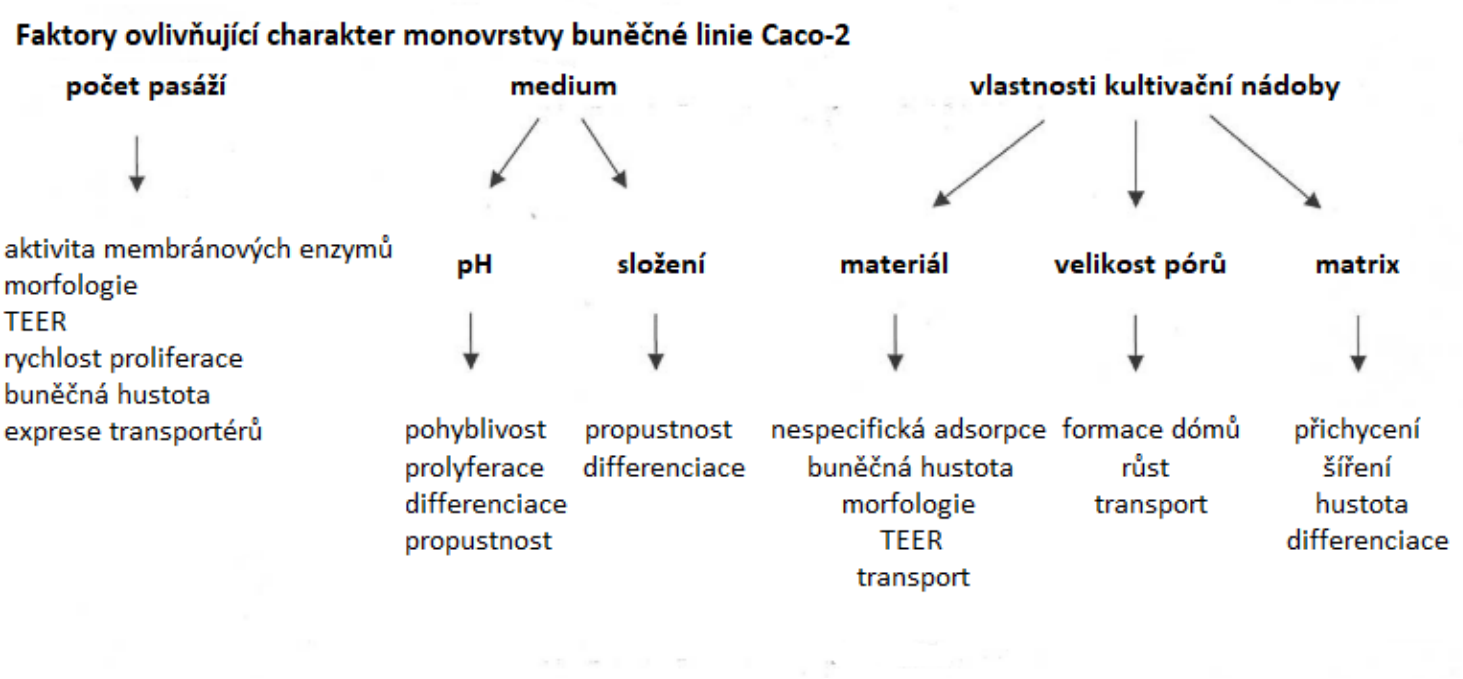
Postupů pro vyhodnocování střevní permeability je celá řada. Od *in vitro* modelů využívajících různých buněčných modelů, přes umělé systémy na bázi lipidů, *ex vivo* modely typu Ussingovy komory nebo akumulace v tenkých řezech (Li, de Graaf, & Groothuis, 2016), *in situ* metody jako je jednoprůchodová perfúzní metoda, *in silico* modely, až po *in vivo* metody založené na zvířecí tkáni (Balimane & Chong, 2005). Pro svou jednoduchost, reprodukovatelnost, možnost jednoduché extrapolace dat a cenu představují však *in vitro* buněčné modely metodu volby pro studium střevní permeability (Balimane & Chong, 2005). Mezi doporučované *in vitro* modely pro studium absorpce léčiv a role membránových transportérů řadíme buněčné linie MDCK, LLC-PK1 a Caco-2 (Anna & Huguet Ninou, 2013; Giacomini et al., 2010). Tyto modely vykazují určité limity, jako jsou nedostatečná exprese CYP3A4 nebo také nedostatečná tvorba tight junctions (LS180) (Yamaura, Chapron, Wang, Himmelfarb, & Thummel, 2016).

5.3.2.1 *In vitro* Caco-2 model

Caco-2 buňky jsou běžně používaným *in vitro* modelem pro kvantifikaci střevní permeability a určení role transportérů v absorpci (Yamaura et al., 2016). Jedná se o etablovanou buněčnou linii, která byla získána z lidského adenokarcinomu tlustého střeva. Odlišuje se od jiných buněčných linií stejného původu tím, že spontánně diferencuje a vytváří monovstvu s morfologickými a funkčními charakteristikami zralého enterocytu. Buňky v monovrstvě mají cylindrický tvar, jsou polarizované s mikroklky na apikální straně a jsou spojené pomocí pevných spojení, tzv. „tight junctions“. Dále také vykazují malou aktivitu střevních hydroláz na apikální straně, které se však v dospělém tlustém střevě člověka nevyskytují. Receptory pro růstové faktory a některé transportní systémy se vyskytují na obou stranách polarizované membrány (Sambuy et al., 2005; Artursson & Karlsson, 1991). Byla zjištěna dobrá korelace v permeabilitě mezi průchodem léčiv přes monovrstvu Caco-2 a absorpcí léčiv *in vivo* u lidí (Hubatsch, Ragnarsson, & Artursson, 2007). To platí jak pro pasivní absorpci, tak pro aktivní transport.

Pro měření integrity monovrstvy je rutinně využíváno měření transepiteliální elektrické rezistence (TEER). Hodnoty TEER jsou závislé na míře buněčné pasáže. Hodnota TEER u monovrstvy Caco-2 je přibližně 300 $\Omega*cm^2$ (Hubatsch et al., 2007). Tato hodnota je podobná jako hodnota naměřená u lidského střeva.

Hustota buněk při nasazování buněk je 300 000 buněk na membránu, při vyšším množství klesá množství exprese některých transportérů jako refluxní pumpy ABCB1. Optimální doba pro kultivace je 21 dní (kdy diferenciace samotná trvá 15-20).



Obrázek 4: Faktory ovlivňující monovrstvu buněk Caco-2
Převzato a upraveno z: (Sambuy et al., 2005)

6. HYPOTÉZA

Inhibice střevních transportérů ABCB1 a ABCG2 může vést ke zvýšení expozice organismu léčivu. Tyto lékové farmakokinetické interakce jsou v řadě případů nežádoucí, protože mohou způsobit vyšší toxicitu léčby a toto riziko stoupá s množstvím medikace, které pacient užívá. Na druhou stranu lze tyto interakce i strategicky využít s cílem snížit dávkování farmaka. Sofosbuvir je známým substrátem ABCB1 a ABCG2. V řadě kombinačních režimů s anti(retrovirotiky) dochází ke zvýšení jeho biodostupnosti. Lze předpokládat vzájemnou interakci těchto léčiv na střevních ABCB1 a ABCG2.

7. CÍL PRÁCE

Studium vlivu vybraných anti(retro)virotik na absorpci sofosbuviru, substrátu ABCB1 a ABCG2, s využitím etablovaného *in vitro* modelu střevní bariéry Caco-2 buněk a tím přispět k vysvětlení molekulární podstaty lékových interakcí sofosbuviru se současně podanými anti(retro)virotiky na úrovní střevní absorpce.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Chemikálie

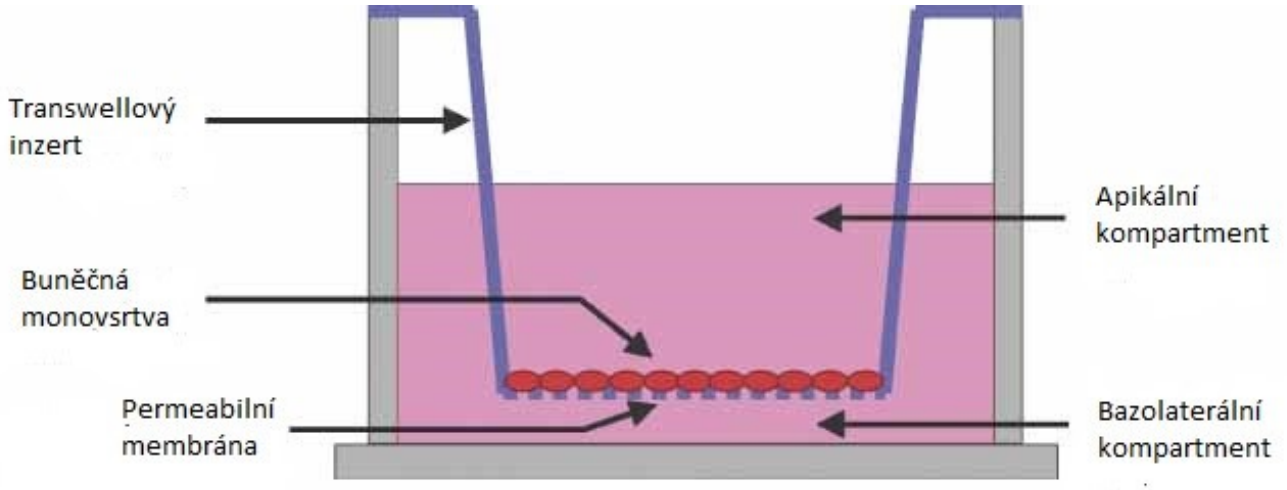
- Sofosbuvir (Scintila (Jihlava, CZ)
- Daclatasvir (Scintila (Jihlava, CZ)
- Ritonavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Zosuquidar (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA)
- Ko134 (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA)
- Simeprevir (Scintila (Jihlava, CZ))
- Didanosin (NIH AIDS Reagent Program)
- Elacridar (GF120918; Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- Abakavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Ledipasvir (Scintila (Jihlava, CZ)
- Atazanavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Zidovudin (NIH AIDS Reagent Program)
- Lopinavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Saquinavir (NIH AIDS Reagent Program)
- DMSO (Dimethyl sulfoxid; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- NEAA (Non-essential Amino Acid; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- P/S (Penicilin/Streptomycin; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- PBS (Phosphate Buffered Saline; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- HBSS ((Hanks´Balanced Salt Solution; Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, MA, USA))
- Hovězí albumin (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA))
- Deuterovaný sofosbuvir (Research Chemicals (Toronto, Kanada))
- $NaHCO_3$ (Penta s.r.o. (Chrudim, CZ))
- HEPES (Carl ROTH (Karlsruhe, Německo))
- MsOH (Metansulfonová kyselina; Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA)

8.2 Kultivace buněk

Při experimentech byla použita buněčná linie Caco-2, obdržená od organizace ATCC (American Type Culture Collection). Buňky byly kultivovány v mediu DMEM, které bylo obohaceno o 10% FBS (fetální hovězí sérum), 1% NEAA (neesenciální aminokyseliny) a 1% P/S (penicilín/streptomycin). Byly udržovány při stále teplotě 37°C v atmosféře s obsahem 5% CO_2 a pasážovány v poměru 1:5.

8.3 Obousměrný transport přes monovrstvu Caco-2

Caco-2 buňky byly nasazovány na inzerty tvořené mikroporózní polykarbonátovou membránou (Transwell® Permeable Support, Corning Incorporated; Cat. No. 3401; 1,12 cm^2; velikost póru 0,4 µm) v koncentraci 300 000 buněk na membránu. Buňky byly kultivovány po dobu 21 dní, přičemž každý druhý den probíhala výměna media. Objem media v bazolaterálním kompartmentu byl 1,5 ml, kdežto v apikálním 0,5 ml. Během tohoto období byla pomocí TEER měřená integrita polarizované monovrstvy buněk.



Obrázek 5: Schématické znázornění jamky s inzertem

Převzaté a upravené z: (Saunders, 2009)

8.4 Měření transepitelární elektrické rezistence (TEER)

TEER slouží jako indikátor integrity polarizované monovrstvy buněk (Yamashita et al., 2000; Hubatsch et al., 2007). TEER jsem měřil pomocí Millpore Milli-Cell Electrical Resistance System (ERS). Tento systém se skládá z dvou elektrod o různé délce tak, aby kratší část těsně doléhala na apikální část transwellu a delší na bazolaterální část. Vzhledem k tomu, že je tato metoda značně závislá na teplotě, bylo třeba elektrody vždy 30 minut temperovat na teplotu 37°C, tj. stejnou teplotu, jako mělo kultivační medium. Před použitím byly elektrody sterilizovány v 70% etanolu a opláchnuty DMEM mezi jednotlivými měřeními. Mezi další faktory ovlivňující TEER patří složení media, číslo pasáže a čas od nasazení buněk (Srinivasan et al., 2015). Naměřené hodnoty před zahájením experimentu byly vyšší než 165 Ω cm^2, což je limitní hodnota poukazující na poruchu integrity polarizované monovrstvy (Hubatsch et al., 2007).

8.5 Průběh experimentu

Testovanou látkou byl sofosbuvir. Množství transportovaného sofosbuviru bylo zkoumáno ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Před zahájením experimentu bylo odsáto kultivační medium. Poté byly buňky omyty PBS temperovaným na teplotu 37°C. Preinkubace (30 min.) probíhala v přítomnosti/nepřítomnosti modelového inhibitoru. Kyselost (pH) preinkubačního media byla upravena pomocí HEPES pufru a MsOH na 6,5 pro apikální kompartment a 7,4 pro bazolaterální kompartment. Stejná úprava pH byla provedena také u inkubačních roztoků. Poté byly preinkubační roztoky odsáty a experiment byl zahájen přidáním roztoků obsahující sofosbuvir (5 µM) do donorové kompartmentu. Akceptorový kompartment obsahoval HBSS s 1% roztokem hovězího sérového albuminu. Odběr vzorků (220 µl) probíhal po 60 a 120 minutách z akceptorového kompartmentu. Odebrané množství po 60 minutách bylo nahrazeno příslušnými roztoky. Vzorky poté byly poslány k změření koncentrace sofosbuviru na katedru analytické chemie Univerzity Karlovy farmaceutické fakulty.

8.6 Analytická část

Před extrakcí byly připraveny kalibrační roztoky sofosbuviru o výsledné koncentraci roztoků 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 500; 1 000; 5 000 nM o dvou kalibračních řadách (pro pH 7,4 a 6,5) pro sestavení kalibrační přímky. Dále byl připraven roztok deuterovaného sofosbuviru (intertní standart) o koncentraci 5 000 nM.

Postup extrakce: do zkumavky o objemu 1,5 ml byly přidány 2 µl roztoku interního standartu. Následně bylo přidáno 100 µl vzorku (nebo kalibračního roztoku) a 200 µl butylacetátu. Roztok byl protřepáván 10 min. při 25 °C a 1 400 g a následně centrifugován 10 min. při 4°C a 14 000 g. Poté byla odebrána vrchní vrstva (extrakční činidlo) do nové zkumavky a roztok byl umístěn do vakuové rotační odparky (55 min. 45 °C), program HV. Rekonstituce proběhla ve 100 µl 80% acetonitril (ACN) a roztok byl převeden do skleněného inzertu ve vialce.

Vzorky byly analyzovány metodou UHPLC-MS/MS. Podmínky izokratické UHPLC metody byly následující: jako mobilní fáze byl použit ACN s 10mmol pufrem acetátu ammoného o pH 6,0 v poměru 80:20. Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min. po dobu 3 minut. Injekční objem byl 2 µl. Pro měření byla použita kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 x 100 mm (1,7 µm).

Podmínky MS/MS detekce: kapilární napětí 0,75 kV, napětí kužele 30 V, napětí extraktoru 2 V, RF napětí čočky 0,1 V, průtok desolvatačního plynu 900 l/hod, průtok plynu kuželem 50 l/hod, desolvatační teplota 450°C, fragmentační dráha sofosbuviru 530 → 243, fragmentační dráha deuterovaného sofosbuviru 535 → 243, kolizní energie 20 eV a teplota zdroje 130 °C. Slabý i silný proplach 80% ACN.

8.7 Výpočet efluxního poměru

Hodnoty směru A-B i B-A jsou v grafech vyjádřeny jako procento koncentrace sofosbuviru aplikovaného v čase T = 0 do donorového kompartmentu, které přešlo a bylo změřeno v daném čase v akceptorovém kompartmentu; naměřené hodnoty v kompartmentu B byly násobeny třemi vzhledem k třikrát většímu objemu v porovnání s donorovým kompartmentem (Hubatsch et al., 2007; Tong et al., 2007). Hodnoty r(BA/AB) jsou vypočítány jako poměr přestupu sofosbuviru ve směru B-A a A-B. Abychom předešli tzv. „sink" fenoménu, který by mohl narušovat linearitu výsledků, r(BA/AB) byl počítán z hodnot, které nepřesáhly 10 % (Hubatsch et al., 2007). FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA) uvádí, že látka je substrátem ABCB1, jestliže je její efluxní poměr větší než dva a vlivem známého inhibitoru se efluxní poměr sníží alespoň o 50 % (Brouwer et al., 2013; FDA, 2017).

8.8 Zpracování dat a použité statistické modely

Grafická podoba výsledků a jejich statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Pro zhodnocení vlivu látek byly použity testy one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's test a nepárový parametrický two-tailed Student´s t-test, který byl také použit pro porovnávání rozdílu transportů směrů A-B a B-A. Statistická významnost byla v grafech vyznačena: *** pro $p \leq 0{,}001$; ** pro $p \leq 0{,}01$; * pro $p \leq 0{,}05$; ns pro $p > 0{,}05$.

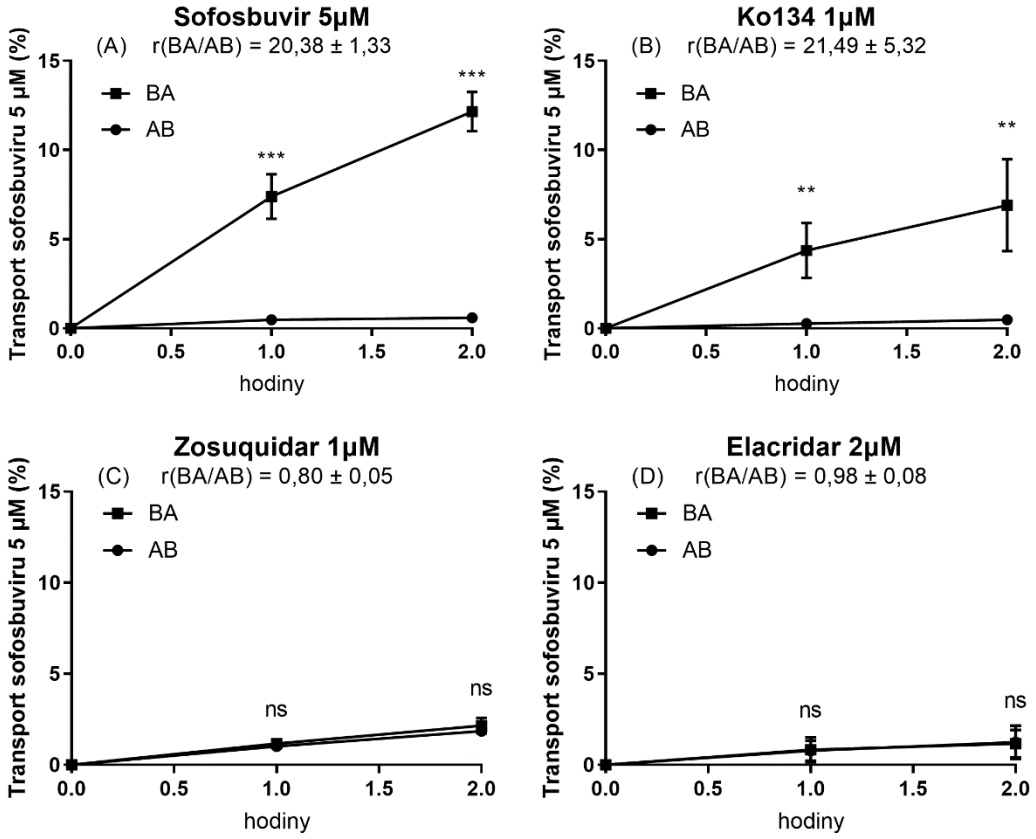
9. VÝSLEDKY

Při experimentech byl sledován transport sofosbuviru přes monovrstvu buněk Caco-2 ve směru A-B a B-A a je vyjádřen jako procento koncentrace sofosbuviru aplikovaného do donorového kompartmentu, který přešel do akceptorového. Transport sofosbuviru byl testován při koncentraci 5 µM (graf 1A, 5). Jako pozitivní kontrola inhibice transportu sofosbuviru (5 µM) byl použit specifický inhibitor ABCG2 Ko134 (1 µM; graf 1B, 5), specifický inhibitor ABCB1, zosuquidar (1 µM; graf 1C, 5) a inhibitor ABCB1/ABCG2 elacridar (2 µM; graf 1D, 5).

V dalším kroku byla testována schopnost inhibitorů HIV proteázy, ritonaviru (50, 100 µM; graf 2, 5), lopinaviru (5, 20, 50 µM; graf 3, 5) a atazanaviru (50 µM; graf 4A, 5), inhibitorů HCV RNA NS5A proteinu, daclatasviru (20 µM; graf 4B, 5) a ledipasviru (50 µM; graf 4C, 5), inhibitoru HCV NS3/A4 serinové proteázy, simepreviru (20 µM; graf 4D, 5), nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy HIV, didanosinu (100 µM; graf 4E, 5) a zidovudinu (100 µM; graf 4F, 5).

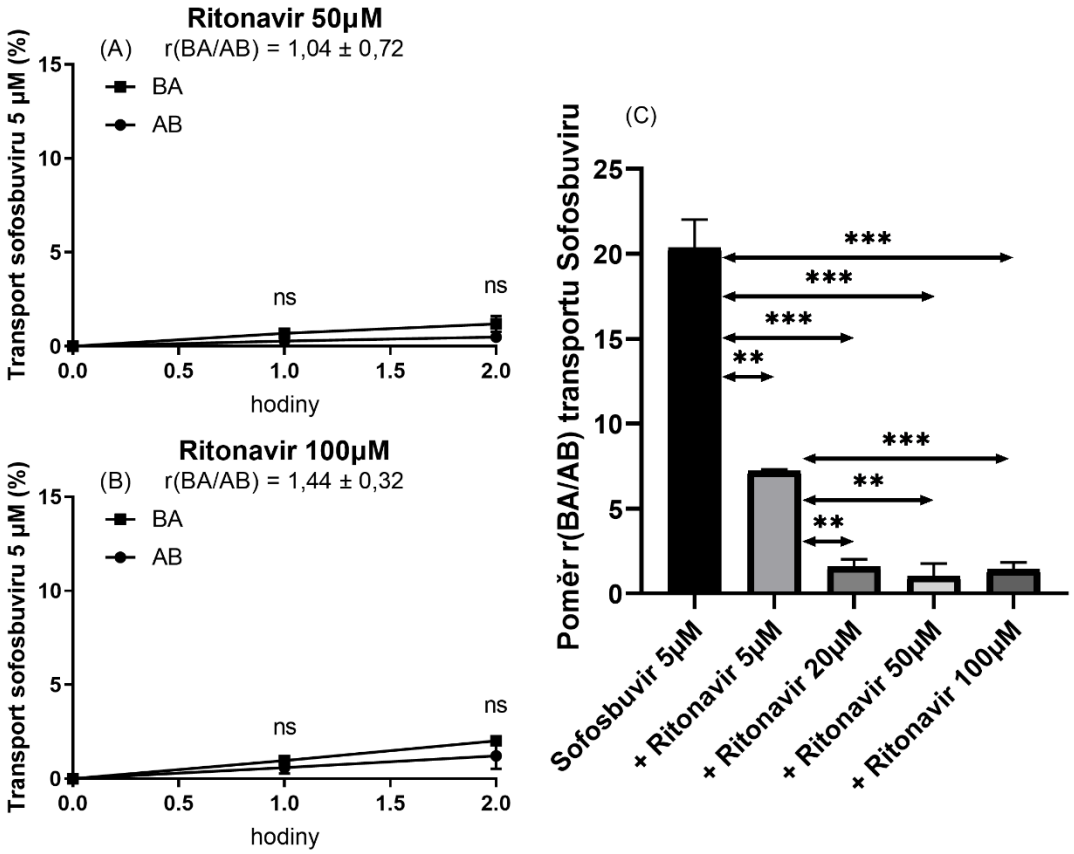
Transport sofosbuviru (5 µM) byl významně vyšší ve směru B-A oproti směru A-B, r(BA/AB) byl 20,38 ± 1,33 (graf 1A). V přítomnosti Ko134 (1 µM) nedošlo k signifikantnímu poklesu r(BA/AB) (graf 1B, 5). Zosuquidar (1 µM) vykazoval výrazný inhibiční efekt - r(BA/AB) = 0,80 ± 0,05 (graf graf 1C, 5). Elacridar (2 µM) snížil r(BA/AB) na hodnoty 0,98 ± 0,08 (graf 1D, 5). Tyto výsledky naznačují, že sofosbuvir je transporován pouze pomocí ABCB1.

Podobný efekt byl pozorován i v případě některých testovaných anti(retro)virotik: ritonaviru 100µM - r(BA/AB) = 1,44 ± 0,32 (graf 2B, 5), lopinaviru 50µM - r(BA/AB) = 0,7 ± 0,06 (graf 3C, 5), atazanaviru 50µM - r(BA/AB) = 1,31 ± 0,38 (graf 4A, 5) a daclatasviru 20µM - r(BA/AB) = 2,20 ± 1,42 (graf 4B, 5). Inhibiční efekt vykazoval také ledipasvir 50µM - r(BA/AB) = 6,68 ± 4,67 (graf 4C, 5), simeprevir 20µM - r(BA/AB) = 6,52 ± 3,15 (graf 4D, 5) a lopinavir 20µM - r(BA/AB) = 4,79 ± 2,76 (graf 3B). Naopak látky zidovudin 100µM - r(BA/AB) = 25,86 ± 14,67 (graf 4E, 5), didanosin 100µM - r(BA/AB) = 41,49 ± 31,68 (graf 4F, 5) nevykazovaly při použitých koncentracích signifikantní inhibiční vliv na transport sofosbuviru; hodnoty r(BA/AB) byly dokonce zvýšeny.



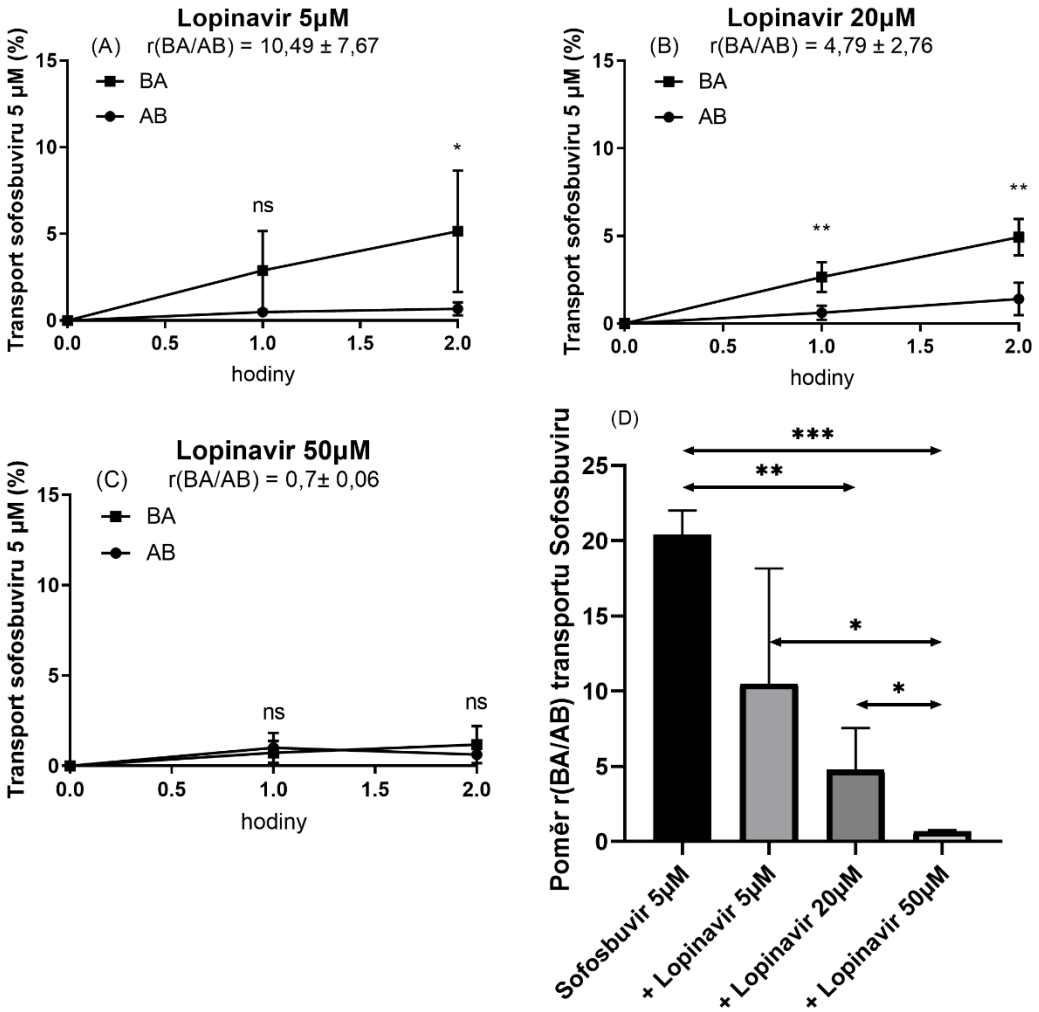
Graf 1: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 μM) bez přítomnosti zkoumaných látek a v přítomnosti specifických inhibitorů ABCB1 a/nebo ABCG2.

*Na grafu A je znázorněn přestup sofosbuviru (5 μM) přes monovrstvu buněk Caco-2 bez přítomnosti inhibitoru, na grafu B v přítomnosti specifického inhibitoru ABCG2 Ko134 (1 μM), na grafu C v přítomnosti specifického inhibitoru ABCB1 zosuquidaru (1 μM) a na grafu D je znázorněn přestup v přítomnosti duálního inhibitoru ABCB1 a ABCG2 elacridaru (2 μM). Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Transport je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu, který přešel do akceptorového po dvouhodinové inkubaci. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) (n = 3). Statistická signifikance byla posuzovaná pomocí t-testu a vyjádřena v grafech s hladinou významnosti: ns $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$*



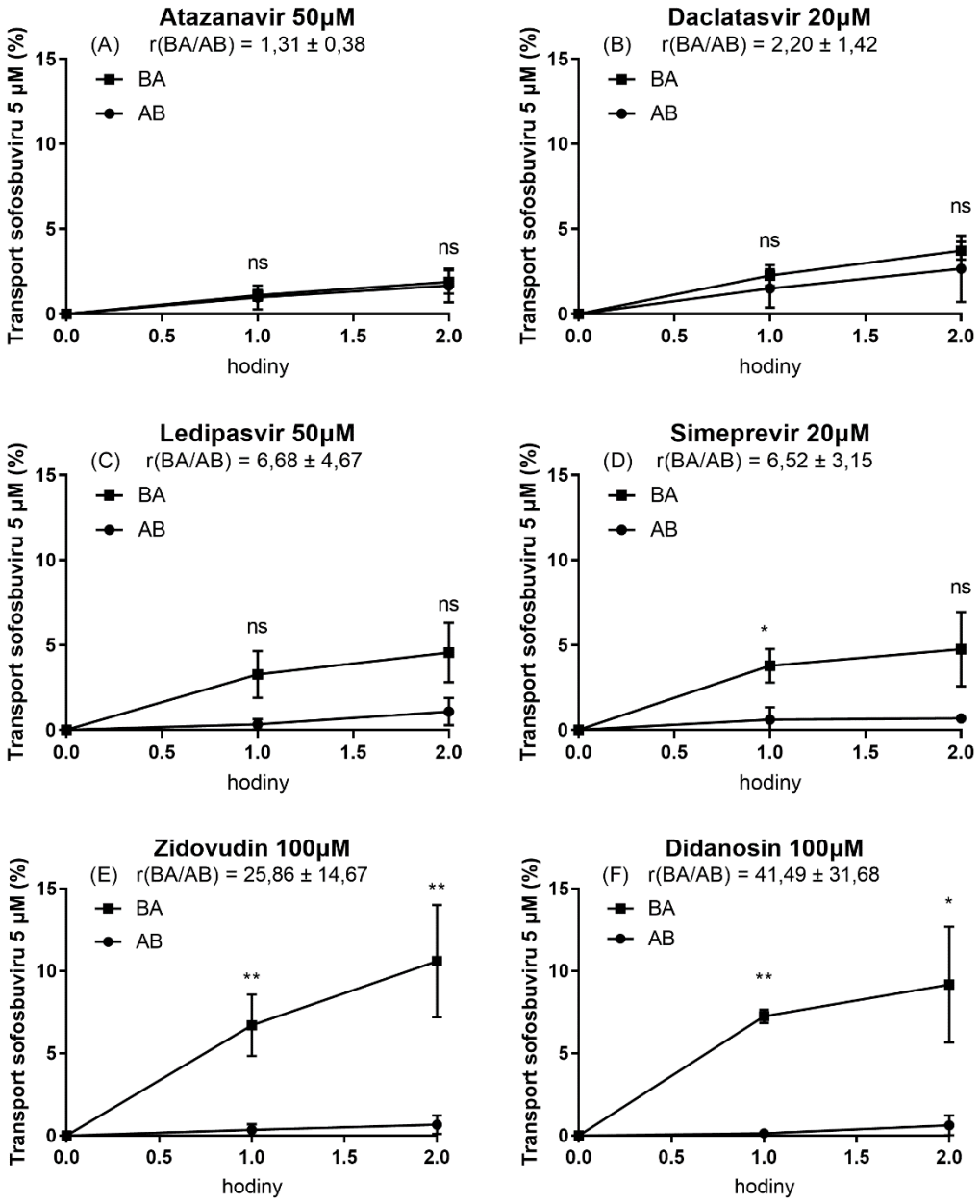
Graf 2: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 µM) v přítomnosti inhibitoru HIV proteázy ritonaviru

*Na grafu A je znázorněn přestup sofosbuviru (5 µM) přes monovrstvu buněk Caco-2 v přítomnosti ritonaviru v koncentraci 50 µM, na grafu B pak přestup v přítomnosti ritonaviru v koncentraci 100 µM. Graf C znázorňuje míru inhibice v závislosti na koncentraci ritonaviru s použitím hodnot r(BA/AB). Hodnoty pro 5, 20µM koncentraci jsou použity z pilotních dat, uvedené hodnoty jsou brány z technického triplikátu. Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Transport je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu, který přešel do akceptorového po dvouhodinové inkubaci. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) (n = 3). Statistická signifikance byla posuzovaná pomocí t-testu a vyjádřena v grafech s hladinou významnosti: ns $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. V grafu C není pro přehlednost vyjádřena statistická signifikance, pokud v porovnávané dvojicí vyjadřovala hladinu významnosti ns.*



Graf 3: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 μM) v přítomnosti inhibitoru HIV proteázy lopinaviru

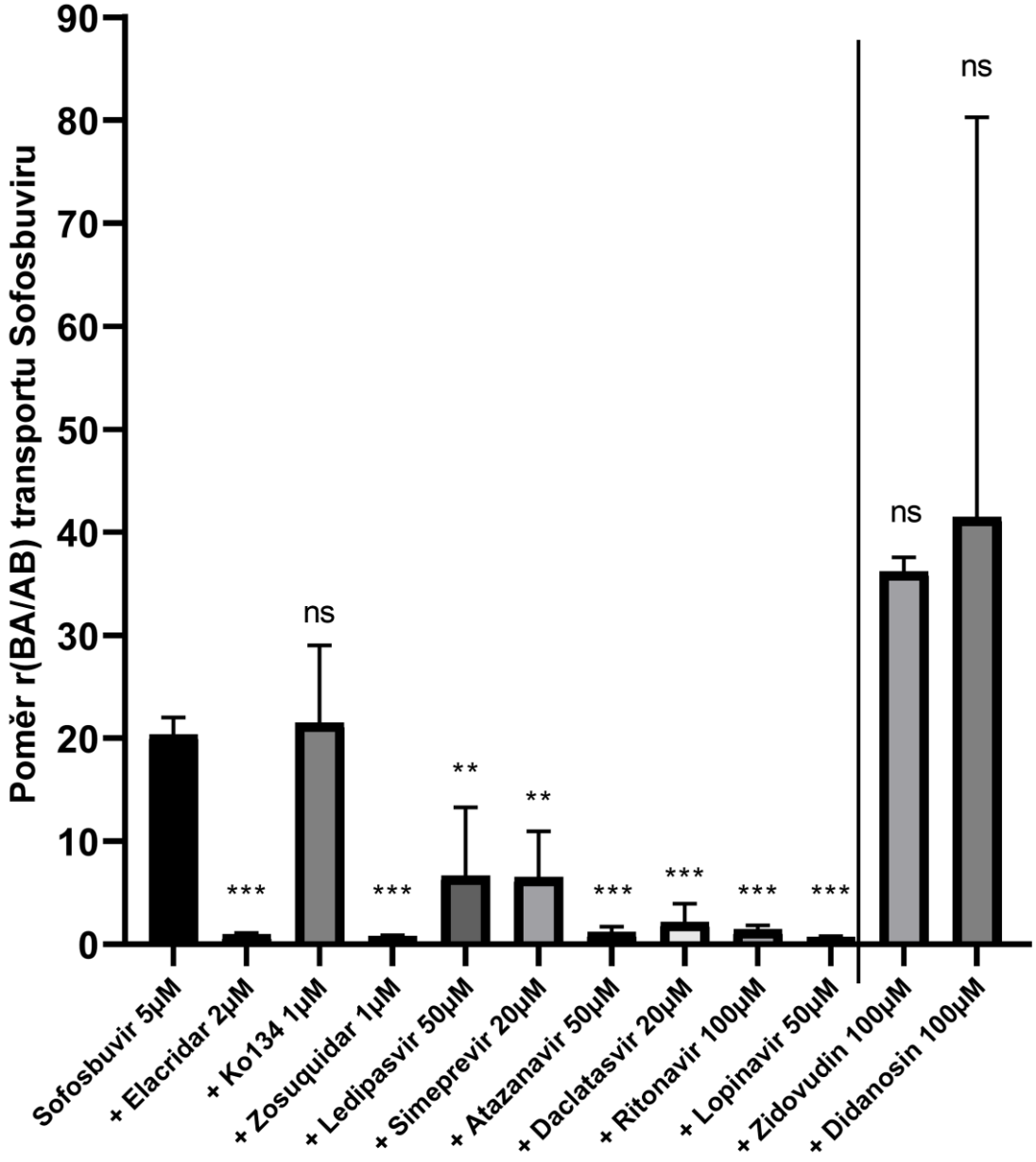
*Na grafu A je znázorněn přestup sofosbuviru (5 μM) přes monovrstvu buněk Caco-2 v přítomnosti lopinaviru v koncentraci 5 μM, na grafu B pak přestup v přítomnosti lopinaviru v koncentraci 20 μM a na grafu C v přítomnosti lopinaviru 50 μM. Graf D znázorňuje míru inhibice v závislosti na koncentraci lopinaviru s použitím hodnot r(BA/AB). Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Transport je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu, který přešel do akceptorového po dvou hodinách inkubace (nebo po jedné hodině, v případě lopinaviru 50 μM). Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) (n = 3). Statistická signifikance byla posuzovaná pomocí t-testu a vyjádřena v grafech s hladinou významnosti: ns P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001. V grafu D není pro přehlednost vyjádřena statistická signifikance, pokud v porovnávané dvojicí vyjadřovala hladinu významnosti ns.*



Graf 4: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 μM) v přítomnosti dalších zkoumaných anti(retro)virotik

Na grafu A je znázorněn přestup sofosbuviru (5 μM) přes monovrstvu buněk Caco-2 v přítomnosti inhibitoru HIV proteázy atazanaviru (50 μM). Transport v přítomnosti inhibitorů HCV RNA NS5A proteinu je znázorněn na grafu B (daclatasvir 20 μM) a na grafu C (ledipasvir 50 μM). Přítomnost inhibitoru HCV NS3/A4 serinové proteázy simepreviru (20 μM) je znázorněn na grafu D. Transport v přítomnosti nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy HIV je znázorněn na grafu E (zidovudin 100 μM) a grafu F (didanosin 100 μM).

*Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Transport je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu, který přešel do akceptorového po dvou hodinách inkubace (nebo po jedné hodině, v případě simepreviru a didanosinu). Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) (n= 3). Statistická signifikance byla posuzovaná pomocí t-testu a vyjádřena v grafech s hladinou významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.*



Graf 5: Porovnání hodnot r(BA/AB) anti(retro)virotik testovaných při maximálních koncentracích na transport sofosbuviru

*Graf vyjadřuje porovnání hodnot r(BA/AB) transportu sofosbuviru přes monovrstvu buněk Caco-2 v přítomnosti testovaných modelových inhibitorů a anti(retro)virotik v maximálních použitých koncentracích. Uvedené hodnoty jsou vyjádřené jako aritmetický průměr ± SD (n = 3). Statistická významnost byla posuzována pomocí one-way ANOVA s post hoc Dunnett testem, s hladinou významnosti: ns P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001. Hodnoty pro zidovudin a didanosin byly statisticky posuzovány zvlášť, pro přehlednost pak byly umístěny s ostatními do jednoho grafu.*

10. DISKUSE

Intestinální efluxní membránové transportéry jsou klinicky významným faktorem ovlivňujícím absorpci perorálně podávaných léčiv. Klinicky velice důležitou skupinu těchto transportérů tvoří rodina ABC transportérů (Zakeri-Milani & Valizadeh, 2014; Schinkel & Jonker, 2012). Řada anti(retro)virotik je substrátem nebo inhibitorem ABC transportérů. Díky tomu, že jsou často užívány v kombinačních režimech, u nich hrozí vysoké riziko lékových interakcí (Kis, Robillard, Chan, & Bendayan, 2010). Sofosbuvir představuje vysoce účinnou a relativně bezpečnou farmakoterapii chronické formy HCV. Rozšíření léčby sofosbuvirem jako v současnosti nejúčinnější léčbou HCV na trhu, však čelí v celosvětovém měřítku několika limitacím. Největší z nich je pak vysoká cena (Forette, 2018).

Jedná se o proléčivo, které je popsaným substrátem ABCG2 a ABCB1 (Squibb, 2013). Lze (u něj) tedy předpokládat, že intestinální absorpce bude těmito transportéry snižována a ABCB1 a ABCG2 budou místem potenciálního vzniku mezilékových interakcí. Tento trend potvrzuje také literatura významným snížením absorpce sofosbuviru indukcí těchto transportérů. Inhibice intestinálních efluxních systémů pak naopak absorpci sofosbuviru může zvyšovat (Cada et al., 2014; Squibb, 2013; Garrison et al., 2018).

Studium lékových interakcí je součástí preklinického výzkumu. Pro výzkum interakcí na lékových transportérech jsou vhodné *in vitro* modely. EMA, FDA a ITC doporučují pro výzkum metodu založenou na obousměrném transportu přes monovrstvu buněk Caco-2 (Huang, 2009; Anna & Huguet Ninou, 2013; Giacomini et al., 2010 Liu et al., 2017).

V této diplomové práci jsem se zaměřil na vliv vybraných anti(retro)virotik na absorpci sofosbuviru a jejich vzájemné interakce na střevních ABCB1 a ABCG2. Sofosbuvir byl testován při koncentraci 5 µM. Tato koncentrace byla zvolena s ohledem i) na snahu se vyhnout saturaci ABCB1a ABCG2 a ii) na detekční limit vyvinuté analytické metody. Testovány byly i koncentrace 50, 100 a 200 µM, ale do data odevzdání diplomové práce byl změřen pouze jeden experiment, jehož výsledky naznačují, že koncentrace vyšší než 50 µM způsobují částečnou saturaci ABCB1 (data neuvedena), což je v souladu s publikovanými daty, kdy bylo zjištěno, že sofosbuvir na buňkách Caco-2 částečně

saturuje eflux (v koncentracích 10 - 2800 µM) (Zheng et al., 2013). Nicméně i při koncentraci 200 µM byly r(BA/AB) vyšší než 10, což stále poukazuje na fakt, že ABCB1 není plně saturované. Použití nízkých nesaturujících koncentrací je v souladu s publikovanými protokoly; tento postup zamezuje vzniku falešně negativních zjištění (Hubatsch et al., 2007).

U inhibitorů byla zvolena maximální rozpustná koncentrace (s horním limitem 100 µM). Závislost koncentrace na míře inhibice známých ABCB1/ABCG2 inhibitorů lopinaviru (5, 20, 50 µM; graf 3) a ritonaviru (50, 100 µM; graf 2), prokázala u lopinaviru závislost míry inhibice na koncentraci inhibitoru (graf 3D). Lopinavir v 5µM koncentraci snížil hodnoty r(BA/AB) na 10,49 ± 7,67; 20µM lopinavir na 4,79 ± 2,76 a 50µM koncentrace na 0,7 ± 0,06. Statistická signifikance u lopinaviru 5µM je zatížena velkou směrodatnou odchylkou. U 50µM a 100µM koncentrace ritonaviru se signifikantní závislost nevyskytovala (snížení r(BA/AB) na 1,04 ± 0,72; respektivě 1,44 ± 0,32). Experimentálně byli zkoušeny u ritonaviru i koncentrace 5, 20 µM, v době sepsání diplomové práce však byli analyticky změřeny pouze jednou, na další výsledky se čeká. Tyto pilotní data však naznačují signifikantní závislost mezi 5µM a 20µM koncentrací ritonaviru. Zvýšení koncentrace nad 20µM zde pak nevedlo ke zvýšení inhibičního efektu (graf 2C). Jednoznačné potvrzení tohoto trendu však vyžaduje dalších experimentů. Lopinavir (od 20µM koncentrace) a ritonavir (ve všech použitých koncentracích) vykazovaly signifikantní inhibiční potenciál. Literatura uvádí u lopinaviru IC_{50} – 1,7 µM a u ritonaviru IC_{50} – 6,7 µM pro inhibici ABCB1 na buňkách Caco-2 (při použití rhodaminu123 jako modelového substrátu) (M. D. Perloff, Von Moltke, & Greenblatt, 2002; Vishnuvardhan, Moltke, Richert, & Greenblatt, 2003). Významný inhibiční vliv zosuquidaru (1 µM; graf 1C, 5) a nesignifikantní vliv Ko134 (1 µM; graf 1B, 5) na transportu sofosbuviru (5 µM) značí, že je sofosbuvir v použité koncentraci substrátem ABCB1, na rozdíl od ABCG2. Zosuquidar snížil r(BA/AB) k hodnotě 0,80 ± 0,05, zatímco r(BA/AB) sofosbuviru zůstal v přítomnosti inhibitoru Ko134 bez signifikantní odpovědi (21,49 ± 5,32). Díky faktu, že monovrstva buněk Caco-2 exprimuje ABCG2 na apikální straně membrány (Xia, Liu, Yang, Miwa, & Gan, 2005) a že Ko134 je zavedeným inhibitorem ABCG2 (Tomaru et al., 2012), lze usuzovat, že v našem uspořádání experimentů se ABCG2 nepodílel na efluxním transportu u buněk Caco-2.

Tento výsledek není v souladu se všeobecně akceptovaným faktem, kde sofosbuvir je substrátem ABCG2 (Squibb, 2013). Všechny dohledatelné publikace však tento fakt přejímají z produktového listu vydaného při vstupu přípravku Sovaldi na trh. V tomto listu ale není uvedena metoda, kterou byl tento fakt zkoumán, a nelze tak vyloučit použití neselektivního ABCB1/ABCG2 inhibitoru na monovrstvě buněk Caco-2. Pro úplné ověření nebo vyloučení interakce sofosbuviru a ABCG2 však bude nutné provést komplementární experiment využívající např. MDCKII buňky s expresí lidského ABCG2. Potvrzení specifity transportu sofosbuviru pro ABCB1 pak naznačuje také vyrovnání transportu A-B a B-A při použití jeho specifického inhibitoru zosuquidaru. Výrazný inhibiční vliv elacridaru na hodnotu r(BA/AB) (0,98 ± 0,08; graf 1D, 5) byl poté pravděpodobně způsobený právě inhibicí na ABCB1. Lze předpokládat stejný trend také u lopinaviru a ritonaviru.

Stejně jako předchozí látky jsou i atazanavir a daclatasvir inhibitory ABCB1 a ABCG2. U atazanaviru uvádí literatura závislost míry inhibice na koncentraci v rozmezí 3-100 µM. Námi zvolená 50µM koncentrace byla zvolena jako maximální rozpustná koncentrace (Perloff, Duan, Skolnik, Greenblatt, & Von Moltke, 2005; Kis, Zastre, Hoque, Walmsley, & Bendayan, 2013; European Medicines Agency , 2018). Oba tyto inhibitory vykazovaly signifikantní inhibiční vliv snížením r(BA/AB) na 1,31 ± 0,38 u atazanaviru (50 µM; graf 4A, 5) a 2,20 ± 1,42 u daclatasviru (20 µM, graf 4B, 5). Signifikantní inhibiční vliv dává výše zmíněným látkám potenciál zvýšit intestinální absorpce substrátů ABCB1 (tedy i sofosbuviru). Vzhledem k tomu, že sofosbuvir není dle výsledků substrátem ABCG2, nelze tento trend přenést i na tento transportér. V této souvislosti bylo prokázáno, že kombinace sofosbuvir + atazanavir (potenciovaný ritonavirem, emtricitabinem a tenofovirem DF) zvýšuje C_{max} sofosbuviru (o 109 %) a AUC (o 342 %) v porovnání s aplikací sofosbuviru bez inhibitoru (Rodriguez-Torres et al., 2015; Zheng et al., 2013).

Stejně jako daclatasvir jsou i ledipasvir a simeprevir v současnosti podávány v kombinačních terapeutických režimech se sofosbuvirem (Zopf et al., 2016). Ledipasvir je dokonce registrován se sofosbuvirem v kombinovaném přípravku (Harvoni). Na rozdíl od přechozích inhibitorů u ledipasviru (50 µM; graf 4C, 5) a simepreviru (20 µM; graf 4D, 5) nedocházelo k tak výraznému snížení hodnot r(BA/AB) (6,52 ± 3,15 u simepreviru; 6,68 ± 4,67 u ledipasviru). Vykazovaly však přesto signifikantní inhibiční efekt (simeprevir

i ledipasvir jsou inhibitory ABCG2 a ABCB1). U ledipasviru literatura uvádí, že zvyšuje AUC digoxinu (substrát ABCB1) o 34 %. Bylo také zjištěno zvýšení AUC sofosbuviru (2,16x) v kombinaci s ledipasvirem, kde byl v literatuře předpokládaný vliv ABCB1 a ABCG2. U ledipasviru, jakožto inhibitoru ABCB1, literatura uvádí významný vliv na farmakokinetiku a absorpci sofosbuviru. Literatura pak uvádí zvýšení AUC sofosboviru v kombinaci se simeprevirem 3,16x a zvýšení C_{max} 1,91x (Ouwerkerk-Mahadevan, Snoeys, Peeters, Beumont-Mauviel, & Simion, 2016; Bourgeois et al., 2017; Talavera Pons et al., 2017).

V minulosti byla také klinicky testována terapeutická kombinace sofosbuvir (400 mg) + simeprevir (150 mg) + ledipasvir (90 mg). Výsledky ukázaly, že tato trojkombinace zvyšuje C_{max} simepreviru 2,3x a AUC 3,1x. U ledipasviru pak bylo zvyšení 1,6x pro C_{max} a 1,7x pro AUC. 80 % pacientů však trpělo nežádoucími účinky (nejčastěji 1. a 2. stupně, kde nejčastější byla fotosenzitivita (45 %), nežádoucí účinky vyššího stupně související s léčbou se zde neobjevily). Tyto nežádoucí účinky však pravděpodobně byly potenciované nežádoucí účinky simepreviru, vlivem zvýšení jeho koncentrace, jelikož při klinickém testování nebylo zjištěno zvýšení četnosti ani závažnosti nežádoucích účinků sofosbuviru při podávání jeho vyšších dávek (až 1200mg v jedné dávce porovnáno s nežádoucími účinky při standartní 400mg). Pro rozsáhlost nežádoucích účinků a rozsáhlost interakcí není pak kombinace doporučována (Bourgeois et al., 2017; Squibb, 2013).

V případě zidovudinu (100 µM; graf 4E, 5) a didanosinu (100 µM; graf 4F, 5) experimenty nejenže neprokázaly inhibiční vliv na transport sofosbuviru (5 µM), ve výsledcích dokonce docházelo ke zvýšení hodnot r(BA/AB) (25,86 ± 14,67 v případě zidovudinu a 41,49 ± 31,68 v případě didanosinu). Je možné, že v obou případech je zvýšení r(BA/AB) dáno velkou variabilitou výsledků s velice nízkými hodnotami ve směru A-B. V obou případech však nedošlo vlivem inhibitorů k signifikantnímu snížení r(BA/AB), což je v souladu s literaturou, která uvádí, že didanosin není inhibitorem ABCB1 ani ABCG2 a že zidovudin je pouze slabým inhibitorem ABCG2, ale není inhibitorem ABCB1 (Janneh & Khoo, 2011; Jeon, 2010). To, že je zidovudin inhibitorem ABCG2 (i když pouze slabým) a nedochází v jeho přítomnosti k signifikantní inhibici pak dále potvrzuje, že sofosbuvir není substrátem ABCG2.

Dále je možné spekulovat, že zvýšení r(BA/AB) bylo způsobeno interakcí na nukleosidových transportech, které blokují transport ve směru A-B a se kterými interagují zidovudin, didanosin a pravděpodobně i sofosbuvir (Pastor-Anglada, Urtasun, & Pérez-Torras, 2018; Young, Yao, Baldwin, Cass, & Baldwin, 2013). Potvrzení této domněnky by však vyžadovalo další experimenty s jinou metodikou.

11. ZÁVĚR

Tato práce zkoumala vliv zvolených anti(retro)virotik na absorpci sofosbuviru s využitím etablované *in vitro* metody založené na buněčné linii Caco-2. Jako pozitivní kontroly transportu byly zvoleny: specifický inhibitor ABCG2 Ko134, specifický inhibitor ABCB1 zosuquidar a inhibitor ABCB1/ABCG2 elacridar. Testovanými anti(retro)virotiky byly: atazanavir, daclatasvir, didanosin, ledipasvir, lopinavir, simeprevir, ritonavir a zidovudin. Z výsledků vyplývá, že střevní absorpce sofosbuviru je značně snižována aktivitou ABCB1. Naše výsledky ukazují, že inhibitory ABCB1 – atazanavir, daclatasvir, ledipasvir, lopinavir, simeprevir a ritonavir mohou zvyšovat absorpci sofosbuviru. Na druhou stranu u didanosinu a zidovudinu nebyl zjištěn signifikantní vliv na ABCB1 zprostředkovaný eflux sofosbuviru. Z výsledků analýzy dat u inhibitorů lopinaviru a ritonaviru, zkoumaných v různých koncentracích, lze předpokládat koncentrační závislost míry inhibice na koncentraci. Pro jednoznačné potvrzení tohoto trendu však bude potřeba dalších experimentů. Naše výsledky přispívají k vysvětlení molekulárních mechanismů lékových interakcí sofosbuviru s ostatními antivirotiky na úrovni střevní absorpce. Zároveň naše výsledky poukazují na možnost vhodnými kombinacemi zvýšit jeho střevní absorpci a tím zlevnit vysoce nákladnou léčbu, např. podáváním menších dávek sofosbuviru v delších časových intervalech.

12. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	*význam zkratky*	*český význam*
ABC	*ATP binding casette*	*ATP vázající protein*
ABCB1	*P-glykoprotein*	*P-glykoprotein*
ABCG2	*breast cancer resistence protein*	*protein rezistence rakoviny prsu*
ACN	*acetonitrile*	*acetonitril*
ATCC	*american Type Culture Collection*	*název organizace*
AUC	*area under the curve*	*plocha pod křivkou*
BCRP	*breast cancer resistence protein*	*protein rezistence rakoviny prsu*
BSEP	*bile salt export pump*	*exportní transportér žlučových solí*
CatA	*katapsin A*	*katapsin A*
CES1	*karboxylesteráza*	*karboxylesteráza*
CES1	*karboxylesteráza*	*karboxylesteráza*
CNS	*centrální nervová soustava*	*centrální nervová soustava*
DAA	*direct antiviral agents*	*přímo působící antivirotikum*
DCV	*daclatasvir*	*daclatasvir*
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*	*název media*
DMSO	*dimethyl sulfoxid*	*dimethyl sulfoxid*
DSV	*dasabuvir*	*dasabuvir*
EC_{50}	*half maximal effective concentration*	*polovina maximální účinné koncentrace*
EMA	*european medicines agency*	*evropská léková agentura*
ERS	*electrical resistence system*	*systém elektrického odporu*
FBS	*fetal bovine serum*	*fetální hovězí sérum*
FDA	*food and drug administration*	*agentura pro kontrolu potravin a léčiv*
GIT	*gastrointestinální trakt*	*gastrointestinální trakt*
GSH	*glutathion*	*glutathion*

HBSS	*Hanks´Balanced Salt Solution*	*název roztoku*
HCV	*hepatitida typu C*	*hepatitida typu C*
HINT1	*histidin triad nucleotid-binding protein*	*protein vázající nukleotidovou triádu sofosbuviru*
IC_{50}	*50 % inhibitory concentration*	*50 % inhibiční koncentrace*
ITC	*international transporter consortium*	*mezinárodní consortium transportérů*
LDV	*ledipasvir*	*ledipasvir*
MATE1	*multidrug and toxin extrusion protein*	*název transportéru*
MRP	*multidrug resistence protein*	*název transportéru*
MsOH	*methylsulfonová kyselina*	*methylsulfonová kyselina*
NBD	*nucleotide binding domain*	*nukleotid vázající doména*
NEAA	*non-essencial amino acid*	*neesenciální aminokyseliny*
OAT	*organic anions transporter*	*transportér organických aniontů*
OATP	*organic anions transporting polypeptide*	*polypeptid transportující organické anionty*
OBV	*ombitasvir*	*ombitasvir*
OCT	*organic cations transporter*	*transportér organických kationtů*
P/S	*penicilin/streptomycin*	*penicilin/streptomycin*
PBS	*phosphate buffered saline*	*fosfátový pufr*
Peg-IFN	*pegylovaný interferon*	*pegylovaný interferon*
P-gp	*P-glykoprotein*	*P-glykoprotein*
PTV	*paritaprevir*	*paritaprevir*
r	*ritonavir*	*ritonavir*
R/RBV	*ribavirin*	*ribavirin*
R(BA/AB)	*poměr transportů směru B-A/A-B*	*poměr transportů směru B-A/A-B*
SLC	*solute carriers transporter*	*název transporteru*
SMV	*simeprevir*	*simeprevir*
SOF	*sofosbuvir*	*sofosbuvir*

TEER	*transepithelial electrical resistance*	*transepiteliární elektrická rezistence*
TMD	*transmembrane domain*	*transmembránová doména*

13. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: V současnosti využívané kombinace anti-HCV farmakoterapeutik dle genotypu HCV. 12

14. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Aktivace a inaktivace sofosbuviru 13
Obrázek 2: Předpokládané sekundární struktury efluxních ABC transportérů. 19
Obrázek 3: Exprese ABCB1 a ABCG2 v různých částech GIT 21
Obrázek 4: Faktory ovlivňující monovrstvu buněk Caco-2 23
Obrázek 5: Schématické znázornění jamky s inzertem 27

15. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 µM) bez přítomnosti zkoumaných látek a v přítomnosti specifických inhibitorů ABCB1 a/nebo ABCG2. 33
Graf 2: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 µM) v přítomnosti inhibitoru HIV proteázy ritonaviru 34
Graf 3: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 µM) v přítomnosti inhibitoru HIV proteázy lopinaviru 35
Graf 4: Časová závislost transportu sofosbuviru (5 µM) v přítomnosti dalších zkoumaných anti(retro)virotik 36
Graf 5: Porovnání hodnot r(BA/AB) anti(retro)virotik testovaných při maximálních koncentracích na transport sofosbuviru 38

16. POUŽITÁ LITERATURA

Anna, & Huguet Ninou. (2013). *Cell lines used for high-throughput screening. Ideal cell-based model*. Retrieved from https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2013/114432/TFG_annahuguetninou.pdf.pdf

Artursson, P., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *175*(3), 880–885. https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91647-U

Balimane, P. V., & Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today*, *10*(5), 335–343. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03354-9

Bhatia, H. K., Singh, H., Grewal, N., & Natt, N. K. (2014). Sofosbuvir: A novel treatment option for chronic hepatitis C infection. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, *5*(4), 278–284. https://doi.org/10.4103/0976-500X.142464

Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., … Wells, J. M. (2014, November 18). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. BioMed Central. https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7

Bourgeois, S., Horsmans, Y., Nevens, F., van Vlierberghe, H., Moreno, C., Beumont, M., … Ouwerkerk-Mahadevan, S. (2017). Pharmacokinetic Interactions between Simeprevir and Ledipasvir in Treatment-Naive Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients without Cirrhosis Treated with a Simeprevir-Sofosbuvir-Ledipasvir Regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(12). https://doi.org/10.1128/aac.01217-17

Brouwer, K. L. R., Keppler, D., Hoffmaster, K. A., Bow, D. A. J., Cheng, Y., Lai, Y., … Evers, R. (2013, July 10). In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. https://doi.org/10.1038/clpt.2013.81

Bugde, P., Biswas, R., Merien, F., Lu, J., Liu, D. X., Chen, M., … Li, Y. (2017, May 4). The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1310841

Cada, D. J., Cong, J., & Baker, D. E. (2014). Sofosbuvir. *Hospital Pharmacy*, *49*(5), 466–478. https://doi.org/10.1310/hpj4905-466

Cunningham, E. B., Amin, J., Feld, J. J., Bruneau, J., Dalgard, O., Powis, J., … Grebely, J. (2018). Adherence to sofosbuvir and velpatasvir among people with chronic HCV infection and recent injection drug use: The SIMPLIFY study. *International Journal of Drug Policy*, *62*, 14–23. https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2018.08.013

Denning, J. M., Cornpropst, M., Clemons, D., Fang, L., Sale, M., Michelle Berrey, M., … J.M. Denning, P. I. P. U. S. (2011). Lack of effect of the nucleotide analog polymerase inhibitor PSI-7977 on methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Hepatology*, *54 SUPPL.*, 544A. Retrieved from http://www.natap.org/2011/AASLD/AASLD_104.htm

Dietrich, C. G., Geier, A., & Oude Elferink, R. P. J. (2003). ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, *52*(12), 1788–1795. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633964

DiMarco, R. L., Hunt, D. R., Dewi, R. E., & Heilshorn, S. C. (2017). Improvement of paracellular transport in the Caco-2 drug screening model using protein-engineered substrates. *Biomaterials*, *129*, 152–162. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.023

Dufour, D. R. (2005). Hepatitis C. In *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian* (pp. 461–471). https://doi.org/10.1385/1-59259-928-1:461

European Medicines Agency (EMA). (2018). Annex I. Summary of product characteristics. KEYTRUDA, 14–16. Retrieved from https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140822129304/anx_129304_en.pdf

Fda. (2013). SOVALDI® (sofosbuvir) tablets, for oral use. Retrieved April 10, 2019, from www.fda.gov/medwatch.

FDA. (2013). Tivicay- Tablets for oral use. Retrieved November 17, 2018, from www.fda.gov/medwatch.

FDA. (2017). In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. *FDA Guidelines*, (October). Retrieved from http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm

Forette, C. (2018). *SOFOSBUVIR TURNS 5 YEARS OLD: THE VAST MAJORITY OF PEOPLE WITH CHRONIC HEPATITIS C STILL HAVE NOT BEEN TREATED*. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260445/WHO-CDS-HIV-18.4-eng.pdf?sequence=1

Fukui, H. (2016). Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflammatory Intestinal Diseases*, *1*(3), 135–145. https://doi.org/10.1159/000447252

Gane, E. J., Stedman, C. A., Hyland, R. H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W. T., … Berrey, M. M. (2013). Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, *368*(1), 34–44. https://doi.org/10.1056/nejmoa1208953

Garrison, K. L., German, P., Mogalian, E., & Mathias, A. (2018). Title: The drug-drug interaction potential of antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C infection. https://doi.org/10.1124/dmd.117.079038

Giacomini, K. M., Huang, S.-M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., … Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *9*(3), 215–236. https://doi.org/10.1038/nrd3028

Herbst, D. A., & Reddy, K. R. (2013). Sofosbuvir, a nucleotide polymerase inhibitor, for

the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *22*(4), 527–536. https://doi.org/10.1517/13543784.2013.775246

Hillgren, K. M., Kato, A., & Borchardt, R. T. (1995). In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews*, *15*(2), 83–109. https://doi.org/10.1002/med.2610150202

Holý, J., & Pešková, M. (2015). Lékové interakce a současná klinická praxe | Kardiologická revue – Interní medicína - proLékaře.cz. Retrieved March 18, 2019, from http://www.kardiologickarevue.cz/kardiologicka-revue-clanek/lekove-interakce-a-soucasna-klinicka-praxe-51704?confirm_rules=1

Huang, S.-M. (2009). In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. *FDA Guidance*, (October). Retrieved from http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm

Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, *2*(9), 2111–2119. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303

Husa, P. (2009). Virová hepatitida C Virus hepatitidy C. *Adiktologie*, *23*(1), 30–33.

Janneh, O., & Khoo, S. H. (2011). Interactions of Tenofovir, Lamivudine, Abacavir and Didanosine in Primary Human Cells. *Pharmaceutics*, *3*(2), 326. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS3020326

Jeon, W. K. (2010). International Review of Cell and Molecular Biology. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (p. 254). https://doi.org/10.1016/s1937-6448(19)30003-6

Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembranes*, *455*(1), 152–162. https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7

Kattakuzhy, S., Levy, R., & Kottilil, S. (2015, April 28). Sofosbuvir for treatment of chronic

hepatitis C. *Hepatology International*. Springer India. https://doi.org/10.1007/s12072-014-9606-9

Keogh, J. P. (2012). Membrane Transporters in Drug Development. *Advances in Pharmacology*, *63*(3), 1–42. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398339-8.00001-X

King, J. R., Dutta, S., Cohen, D., Podsadecki, T. J., Ding, B., Awni, W. M., & Menon, R. M. (2016). Drug-Drug Interactions between Sofosbuvir and Ombitasvir-Paritaprevir-Ritonavir with or without Dasabuvir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(2), 855–861. https://doi.org/10.1128/AAC.01913-15

Kirby, B. J., Symonds, W. T., Kearney, B. P., & Mathias, A. A. (2015). Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. *Clinical Pharmacokinetics*, *54*(7), 677–690. https://doi.org/10.1007/s40262-015-0261-7

Kirby, B., & Mathias, A. (2012). No clinically significant pharmacokinetic drug interactions between sofosbuvir (GS-7977) and HIV antiretrovirals atripla®, rilpivirine, darunavir/ritonavir, or raltegravir in healthy volunteers6089. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. Retrieved from http://www.natap.org/2012/AASLD/AASLD_64.htm

Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N. Y., & Bendayan, R. (2010). The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, *31*(1), 22–35. https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.10.001

Kis, O., Zastre, J. A., Hoque, M. T., Walmsley, S. L., & Bendayan, R. (2013). Role of Drug Efflux and Uptake Transporters in Atazanavir Intestinal Permeability and Drug-Drug Interactions. *Pharmaceutical Research*, *30*(4), 1050–1064. https://doi.org/10.1007/s11095-012-0942-y

Lawitz, E., Mangia, A., Wyles, D., Rodriguez-Torres, M., Hassanein, T., Gordon, S. C., … Gane, E. J. (2013). Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *New England Journal of Medicine*, *368*(20), 1878–1887. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214853

Lexová, P., Částková, J., Kynčl, J., Manďáková, Z., & Němeček, V. (2015). *Výskyt virových hepatitid v České republice-rok 2015 a trendy v posledních deseti letech Viral hepatitides in the Czech Republic in 2015 and trends in the last decade INFORMACE Z NRL A ODBORNÝCH PRACOVIŠŤ CEM INFORMATION FROM THE NRL AND RESEARCH GROUPS O*. Retrieved from http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Hepatitidy/2015_trendy_vir_hep_v_CR.pdf

Li, M., de Graaf, I. A. M., & Groothuis, G. M. M. (2016). Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *12*(2), 175–190. https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1125882

Liu, X., Zheng, S., Qin, Y., Ding, W., Tu, Y., Chen, X., … Cai, X. (2017). Experimental evaluation of the transport mechanisms of PoIFN-α in Caco-2 cells. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(NOV), 781. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00781

Lumen, A. A., Li, L., Li, J., Ahmed, Z., Meng, Z., Owen, A., … Bentz, J. (2013). Transport Inhibition of Digoxin Using Several Common P-gp Expressing Cell Lines Is Not Necessarily Reporting Only on Inhibitor Binding to P-gp. *PLoS ONE*, *8*(8), e69394. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069394

Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2005). Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal*, *7*(1), E118-33. https://doi.org/10.1208/aapsj070112

Mathias, A. (2012). No clinically significant pharmacokinetic drug-drug interactions between sofosbuvir (GS-7977) and the immunosuppressants, cyclosporine A or tacrolimus in healthy volunteers6094. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. Retrieved from http://www.natap.org/2013/HCV/010713_03.htm

Montanari, F., & Ecker, G. F. (2015). Prediction of drug–ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *86*, 17–26. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.001

Ouwerkerk-Mahadevan, S., Snoeys, J., Peeters, M., Beumont-Mauviel, M., & Simion, A.

(2016, February). Drug–Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir. *Clinical Pharmacokinetics*. Springer. https://doi.org/10.1007/s40262-015-0314-y

Parekh, M., Kamal, K., Miller, R., Koerner, P., Giannetti, V., & Craft, Z. (2016). Assessment of Patient Adherence and Utilization of Sofosbuvir-Based Regimens: A Real-World Data Analysis. *Value in Health*, *19*(3), A18. https://doi.org/10.1016/j.jval.2016.03.405

Pastor-Anglada, M., Urtasun, N., & Pérez-Torras, S. (2018). Intestinal nucleoside transporters: Function, expression, and regulation. *Comprehensive Physiology*, *8*(3), 1003–1017. https://doi.org/10.1002/cphy.c170039

Perloff, E. S., Duan, S. X., Skolnik, P. R., Greenblatt, D. J., & Von Moltke, L. L. (2005). Atazanavir: Effects on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, *33*(6), 764–770. https://doi.org/10.1124/dmd.104.002931

Perloff, M. D., Von Moltke, L. L., & Greenblatt, D. J. (2002). Fexofenadine transport in Caco-2 cells: Inhibition with verapamil and ritonavir. *Journal of Clinical Pharmacology*, *42*(11), 1269–1274. https://doi.org/10.1177/009127002762491370

Rivero-Juarez, A., Brieva, T., Frias, M., & Rivero, A. (2018). Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of the combination of daclatasvir/sofosbuvir/ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *14*(9), 901–910. https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1506765

Rodriguez-Torres, M., Gaggar, A., Shen, G., Kirby, B., Svarovskaia, E., Brainard, D., … Rodriguez-Orengo, J. (2015). Sofosbuvir for chronic hepatitis C virus infection genotype 1-4 in patients coinfected with HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *68*(5), 543–549. https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000516

Rodriguez-Torres, M., Lawitz, E., Kowdley, K. V., Nelson, D. R., DeJesus, E., McHutchison, J. G., … Lalezari, J. (2013). Sofosbuvir (GS-7977) plus peginterferon/ribavirin in

treatment-naïve patients with HCV genotype 1: A randomized, 28-day, dose-ranging trial. *Journal of Hepatology*, *58*(4), 663–668. https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2012.11.018

Ruiz Mariana, J. (2008). File:Digestive system without labels.svg - Wikimedia Commons. Retrieved April 11, 2019, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Digestive_system_without_labels.svg?fbclid=IwAR1p_qs_IK2raAe8mgpncS_DK6KXhnyhwPdX3a8Pb1JN70UWqP9HYYi4N68

Russell-Jones, G. . (2002). The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery1PII of original article: S0169_409X(96)00334-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 20 (1996) 83–97.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *46*(1–3), 59–73. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00127-7

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005, January). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., & Váradi, A. (2006). Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiological Reviews*, *86*(4), 1179–1236. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2005

Saunders, M. (2009, November). Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. https://doi.org/10.1002/wnan.53

Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.027

Squibb, B.-M. (2013). *Annex i (summary of product characteristcs)*. Retrieved from

http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180706141486/anx_141486_en.pdf

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*, *20*(2), 107–126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025

SÚKL. (2018). P ř íloha i souhrn údaj ů o p ř ípravku 1, 1–33. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/sovaldi-epar-product-information_cs.pdf

Talavera Pons, S., Boyer, A., Lamblin, G., Chennell, P., Châtenet, F.-T., Nicolas, C., … Abergel, A. (2017). Managing drug-drug interactions with new direct-acting antiviral agents in chronic hepatitis C. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *83*(2), 269–293. https://doi.org/10.1111/bcp.13095

Tomaru, A., Morimoto, N., Morishita, M., Takayama, K., Fujita, T., Maeda, K., … Sugiyama, Y. (2012). Studies on the Intestinal Absorption Characteristics of Sulfasalazine a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Substrate. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *28*(1), 71–74. https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-12-nt-024

Tong, L., Phan, T. K., Robinson, K. L., Babusis, D., Strab, R., Bhoopathy, S., … Ray, A. S. (2007). Effects of human immunodeficiency virus protease inhibitors on the intestinal absorption of tenofovir disoproxil fumarate in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(10), 3498–3504. https://doi.org/10.1128/AAC.00671-07

Urbánek, P. (2014). Sofosbuvir – Aktuality – Články – Remedia – farmakoterapeutický časopis. Retrieved November 17, 2018, from http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Sofosbuvir/6-E-1Gr.magarticle.aspx

Urbánek, P., Husa, P., Šperl, J., Fraňková, S., Plíšek, S., Roźnovský, L., & Kúmpel, P. (2017). Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). *Klinicka Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi*. https://doi.org/10.14735/amgh2017117

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, *3*(3), 281–290. https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281

Vishnuvardhan, D., Moltke, L. L., Richert, C., & Greenblatt, D. J. (2003). Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein. *AIDS (London, England)*, *17*(7), 1092–1094. https://doi.org/10.1097/01.aids.0000060380.78202.b5

Ward, A. B., Szewczyk, P., Grimard, V., Lee, C.-W., Martinez, L., Doshi, R., … Chang, G. (2013). Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(33), 13386–13391. https://doi.org/10.1073/pnas.1309275110

Xia, C. Q., Liu, N., Yang, D., Miwa, G., & Gan, L. S. (2005). Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition*, *33*(5), 637–643. https://doi.org/10.1124/dmd.104.003442

Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., & Tokuda, H. (2000). Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(3), 195–204. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00076-2

Yamaura, Y., Chapron, B. D., Wang, Z., Himmelfarb, J., & Thummel, K. E. (2016). Functional Comparison of Human Colonic Carcinoma Cell Lines and Primary Small Intestinal Epithelial Cells for Investigations of Intestinal Drug Permeability and First-Pass Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *44*(3), 329–335. https://doi.org/10.1124/dmd.115.068429

Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013, April 1). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*. Pergamon. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007

Zakeri-Milani, P., & Valizadeh, H. (2014). Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *10*(6), 859–871. https://doi.org/10.1517/17425255.2014.905543

Zheng, J. H., Pharmacometrics Reviewer Jeff Florian, P., Pharmacogenomics Reviewer Sarah Dorff, P., Seo, S., Pharmacometrics Reviewer Yaning Wang, S., & Pacanowski, M. (2013). *OFFICE OF CLINICAL PHARMACOLOGY REVIEW: ADDENDUM Secondary Clinical Pharmacology Reviewer Secondary Pharmacogenomics Reviewer*. Retrieved from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/204671Orig1s000ClinPharmR.pdf

Zopf, S., Kremer, A. E., Neurath, M. F., & Siebler, J. (2016). Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next? *World Journal of Hepatology*, *8*(3), 139–147. https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i3.139