

Oponentský posudek na disertační práci: Interakce antiretroviálních léčiv s membránovými transportéry.

Autor: Mgr. Ondřej Martinec

Disertační práce je předkládána k obhajobě před ukončením doktorského studia v oboru Farmakologie a toxikologie na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Byla vypracována pod odborným vedením školitele pana doc. PharmDr. Lukáše Červeného, Ph.D.

Kombinační farmakoterapie antivirotiky dosahuje v současnosti významných úspěchů v léčbě HIV a hepatitidy C. Za její problematickou stránku je možné označit vysoký potenciál k lékovým interakcím na úrovni transportu i metabolismu. Práce se zaměřuje na aktuální problematiku vlivu efluxních transportérů v lumenální membráně enterocyty na absorpci antiretrovirových léčiv proti HIV infekci a nové generace přímo a specificky působících antivirotik určených k léčbě hepatitidy C. Obě infekční onemocnění jsou léčena kombinacemi antivirotik, koinfekce oběma viry není málo častá stejně jako současně prováděná farmakoterapie přidružených onemocnění. Proto má experimentální a klinický výzkum v této oblasti mimořádný význam pro optimalizaci farmakoterapie. Téma disertační práce je nanejvýš aktuální.

Školitelské pracoviště je mezinárodně uznávané a má dlouholetou tradici výzkumu transportérů pro léčiva. Uchazeč dále načerpal cenné zkušenosti při zahraniční stáži a široké portfolio metod domácího pracoviště pomohl rozšířit o metodu na studium intestinálního transportu *ex vivo* pomocí ultratenkých jejunálních řezů.

Hodnocení formální stránky disertační práce:

Disertační práce má formu komentovaného souboru 4 prací publikovaných v časopisech s impaktním faktorem a další práce, která je v recenzním řízení. Má všechny standardní náležitosti a je přehledně uspořádána. Z celkového rozsahu je 28 stran věnováno úvodu a teoretické části. Teoretická část je poměrně stručná, ale akcentuje a dobře vysvětluje informace se vztahem k cílům práce, a to i za pomoci zdařilých ilustrací. Úvod pojednává o expresi a funkci efluxních ABC transportérů a farmakokinetických interakcích, jejichž příčinou je inhibice nebo indukce těchto proteinů. Další část se zaměřuje na strukturu a bariérovou funkci střev a mechanismy střevní absorpce léčiv. Vzhledem k zaměření disertace jsou diskutovány a porovnávány experimentální metody *in vivo*, *in vitro* a *in silico*, vhodné ke zjišťování vlivu absorpční a metabolické funkce střev na farmakokinetiku. Závěr teoretické části je věnován charakterizaci HIV a HCV infekcí, jejich léčbě a popisuje základní vlastnosti antivirotik studovaných v rámci disertační práce. Podle názoru oponenta mohl být uveden komplexnější přehled transportérů ve střevní bariéře, zahrnující lumenální absorpční transportéry (influxní) a transportéry na bazolaterální membráně enterocyty. Větší pozornost by si zasloužilo porovnání významu transmembránového přestupu léčiv ve střevě pasivní difuzí a přestupu zprostředkovaného transportéry, a to ve vztahu ke struktuře léčiva, biofarmaceutický klasifikační systém a navazující „Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System“, který upřesňuje odhad biodostupnosti léčiv začleněním transportérů a metabolismu do klasifikačního systému. Naopak zbytečně podrobné jsou pasáže o životním cyklu HIV a HCV.

Pracovní hypotéza a cíle práce jsou jasně formulovány. Kladně hodnotím komentáře k předloženým pracím, které přehledně shrnují dosažené výsledky výzkumu a jejich význam. Kapitola Souhrn a závěr svojí kvalitou přesahuje obvyklou úroveň, se kterou se oponent setkává při hodnocení disertací. K výsledkům vlastního výzkumu pomocí *in vitro* a *ex vivo* metod byly důsledně vyhledány publikované klinické farmakokinetické studie. V kapitole jsou objektivně

zhodnoceny výsledky vlastního výzkumu a přednosti a nedostatky použitých metod a vytyčeny směry navazujícího výzkumu.

V práci jsou drobné stylistické chyby. Za zbytečné považují časté používání přívlastků typu „léčivo je popsáným substrátem, léčivo je prokázáný induktor“.

Hodnocení výsledků výzkumu a splnění cílů práce:

Cíl práce 2, publikace 7.1.

Martinec O, Huliciak M, Staud F, Cecka F, Vokral I, Cerveny L. Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(11):e00910-19.

Inhibiční potenciál anti-HIV a anti HCV léčiv (celkem 13 léčiv) vůči ABCB1 transportéru byl hodnocen *in vitro* na modelu obousměrného transportu přes monovrstvu Caco-2 buněk a *ex vivo* formou akumulčních studií využívajících rhodamin 123 a izolované ultratenké řezy z potkaního ilea a lidského jejunu (5 dárců). **Jedná se o první takto komplexní studii interakce antivirotik s P-glykoproteinem s využitím výše popsaných metod.** Výsledky ukazují, že transportní aktivita ABCB1 ve střevě není významně inhibována abakavirem, zidovudinem, TDF, etravirinem a rilpivirinem, zatímco byl zaznamenán inhibiční účinek lopinaviru, ritonaviru, saquinaviru, atazanaviru, maravirocu, ledipasviru a daclatasviru. Výsledky *in vitro* a *in vivo* v potkaních PCIS byly dobře srovnatelné, zatímco výsledky akumulčních studií s PCIS z jejunu dárců se v případě inhibitorů HIV proteázy shodovaly a u antivirotik z jiných skupin byly pozorovány rozdíly.

Otázka 1: V diskuzi poukazujete na skutečnost, že použité koncentrace některých léčiv byly nízké ve srovnání s koncentracemi v lumen střeva po podání pacientům. Můžete uvést způsob odhadu koncentrací v blízkosti lumenální membrány nebo zda existují pro vámi studované látky (alespoň některé) nebo podobné látky výsledky měření koncentrací v lumen střeva na modelech *in vivo/in situ*? Je správný názor oponenta, že výše uvedené závěry o absenci inhibičního vlivu na P-glykoprotein nejsou definitivní – negativní prediktivní hodnota je nízká a není vyloučena možnost interakce?

Otázka 2: Kam je možné zařadit studovaná léčiva v rámci systémů BCS a BDDS? Do jaké míry se u studovaných antivirotik uplatňují absorpční (influxní) transportéry v lumenální membráně?

Cíl práce 3, manuskript 7.2.

Martinec O, Biel C. de Graaf IA, Huliciak M, Staud F, Vokřál I, Červený L, Olinga P

Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)

Práce hodnotí PCIS z lidského jejunu jako model pro indukci transportéru ABCB1 (P-glykoprotein). Výsledky potvrdily viabilitu PCIS po dobu 48 hodin – nezměněnou morfologii výstelky, konstantní obsah ATP a genovou, proteinovou expresi a transportní aktivitu ABCB1. Stabilní byla také genová exprese nukleárních receptorů *PXR* a *RXR α* . Modelový induktor a ligand *PXR* rifampicin zvýšil genovou a proteinovou expresi a aktivitu ABCB1 (akumulční

studie s rhodaminem) a genovou expresi *CYP3A4*. Výsledky naznačují, že PCIS jsou vhodným modelem pro studium indukce ABCB1 v časovém horizontu 48 hodin.

Otázka 3. Jaký vliv má omezení na 48 hodin? Můžete uvést příklady časového průběhu indukce ABCB1 jinými ligandy na modelech *in vitro/ex vivo*?

Cíl práce 1, publikace 7.3.

Reznicek J, Ceckova M, Ptackova Z, Martinec O, Tupova L, Cerveny L, Staud F. MDR1 and BCRP Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction between Rilpivirine and Abacavir and Effect on Intestinal Absorption. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9):e00837-17.

Na úrovni *in vitro* (akumulační a transportní experimenty s MDCKII buňkami exprimujícími ABC transportéry a intestinálními Caco-2 buňkami) a *in vivo* (farmakokinetická studie na potkanech) byl studován vliv rilpivirinu na farmakokinetiku abakaviru.

Práce obohatila informace o inhibičních vlastnostech rilpivirinu vůči hlavním transportérům pro léčiva a také upozornila na možnost interakce rilpivirinu s abakavirem ve fázi absorpce po perorálním podání, zprostředkované transportéry MDR-1 a BCRP.

Publikační aktivita uchazeče

Mgr. Martinec je prvním autorem původní vědecké práce a spoluautorem původní práce, otištěných v časopise *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* s vysokým IF 4,715 (v prvním decilu dle AIS a IF). Druhý prvoautorský manuskript byl odeslán do *Biochemical Pharmacology* (IF 4,96) a má podle názoru oponenta velkou kvalitu a šanci na přijetí. Obsažné a kvalitní přehledové práce, otištěné v časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF 2,98), popisují mechanismy účinku a terapeutické využití antivirotik a velmi detailně se věnují jejich analýze v biologických vzorcích. Dá se očekávat jejich velký citační ohlas. Všechny práce prošly náročným oponentním řízením v renomovaných vědeckých časopisech, jehož kladný výsledek je potvrzením originality témat a významu výsledků, stejně jako kvality použitých metod. Uchazeč prezentoval výsledky formou 4 přednášek na domácích konferencích a 5 posterů (2 na zahraničních konferencích).

Závěr a doporučení

Předložená disertační práce má vysokou kvalitu. Mgr. Martinec prokázal schopnost dobře teoreticky a prakticky zvládnout náročné výzkumné projekty a mnoho experimentálních technik. Disertační práce a publikace s vysokým impaktním faktorem přinášejí originální poznatky a dokazují rozhled v dané problematice a odborné vyjadřovací schopnosti.

Proto doporučuji komisi pro obhajobu, aby přijala disertační práci jako podklad pro udělení akademického titulu Ph.D.

V Hradci Králové, 24. 11. 2020

Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.
Ústav farmakologie
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta Hradec Králové