

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

***IN VITRO A EX VIVO* STUDIUM LÉKOVÝCH  
INTERAKCÍ ANTIVIROTIK NA STŘEVNÍCH  
MEMBRÁNOVÝCH TRANSPORTÉRECH**

Diplomová práce

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

**Prohlášení:**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

.....

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za to, že mi umožnil vypracovat diplomovou práci na Katedře farmakologie a toxikologie, za jeho odborné rady a připomínky, bez kterých bych se při psaní této práce rozhodně neobešla, a v neposlední řadě za obrovskou trpělivost, kterou se mnou při jejím opravování měl.

Můj velký dík dále patří Mgr. Martinu Huličiakovi, a to nejen za neocenitelnou pomoc při realizaci experimentální části této práce, poskytování rad při vyhodnocování jejích výsledků, ale i za vytvoření příjemného pracovního prostředí a přátelské atmosféry.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za jeho pomoc při realizaci experimentů na rPCIS a PharmDr. Ivoně Lhotské, Ph.D. za provedení HPLC analýzy, bez níž by vyhodnocení experimentální části této práce nebylo možné.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Veronika Halodová

Školitel: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* a *ex vivo* studium lékových interakcí antivirotik na střevních membránových transportérech

Tenofovir (TFV) je lékem volby v terapii infekce virem hepatitidy B (HBV) u pacientů starších 12 let a jedním z léků volby v rámci kombinované antiretrovirální terapie (cART) infekcí vyvolaných virem lidské imunodeficiency (HIV).

Pro p.o. aplikaci TFV byla vyvinuta dvě komerčně dostupná proléčiva, tenofovir disoproxil fumarát (TDF) a tenofovir alafenamid fumarát (TAF), která zvyšují prostupnost TFV přes buněčné membrány a jeho biodostupnost po p.o. podání.

Mezi faktory, které mohou ovlivnit biodostupnost léčiv po p.o. podání, patří mimo jiné efluxní transportéry, a to zejména P-glykoprotein (ABCB1, P-gp) a Breast cancer resistance protein (ABCG2, BCRP). Bylo již dříve prokázáno, že jak TDF, tak i TAF jsou substráty obou těchto transportérů.

Cílem této diplomové práce bylo, pomocí *in vitro* a *ex vivo* modelů střevní bariéry, zhodnotit vliv efluxních transportérů na přestup TDF a TAF přes střevní bariéru a na jejich akumulaci v ultratenkých řezech střeva potkana (rPCIS) a dále porovnat stabilitu TDF a TAF ve střevě a rychlost jejich metabolizace v lumen potkaního střeva.

Pomocí dat získaných studii provedenými na buněčné linii Caco-2 (buňky lidského epitelálního kolorektálního adenokarcinomu) se podařilo potvrdit, že obě výše zmiňovaná proléčiva jsou substráty efluxního transportéru ABCB1. Vliv specifické inhibice ABCG2 na transport TDF a TAF se při studiích na Caco-2 buněčné linii neprojevil. Vliv inhibice ABCB1 na transport TDF a TAF byl patrný i při použití rPCIS. Inhibice ABCB1 vedla ke zvýšené akumulaci metabolitů TDF a TAF v buňkách rPCIS. Data získaná z rPCIS studií dále potvrdila, že TDF je v porovnání s TAF ve střevě méně stabilní a je rychle rozkládán střevními hydrolázami.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Veronika Halodová

Supervisor: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* and *ex vivo* study of drug-drug interactions of antivirals on intestinal membrane transporters

Tenofovir (TFV) is the first-line agent in the treatment of hepatitis B virus (HBV) infection for patients aged over 12 years and one of the first-line choices for the combination antiretroviral therapy (cART) of infections caused by human immunodeficiency virus (HIV).

Two commercially available prodrugs have been developed for oral administration of TFV, tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and tenofovir alafenamide fumarate (TAF). These prodrugs increase TFV membrane permeability and oral bioavailability.

One of the factors that can affect the bioavailability of orally administered drugs is active transport mediated by efflux transporters, mainly by P-glycoprotein (ABCB1, P-gp) and Breast cancer resistance protein (ABCG2, BCRP). It has been already proved that TDF and TAF are substrates of both of these transporters.

The goal of this diploma thesis was to use *in vitro* and *ex vivo* models of intestinal barrier to assess the impact of the efflux transporters on TDF and TAF transport in the intestine and on their accumulation in rat precision-cut intestinal slices (rPCIS). We also focused on comparing the stability and metabolism of TDF and TAF in the rat intestine.

Data from our studies on Caco-2 cell line (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells) confirmed that both TDF and TAF are substrates of efflux transporter ABCB1. Specific inhibition of ABCG2 did not affect TDF and TAF transport across Caco-2 cell monolayer. Effect of ABCB1 inhibition was also seen using rPCIS. ABCB1 inhibition resulted in increased accumulation of TDF and TAF metabolites in rPCIS. Data from our studies on rPCIS also confirmed that TDF is in intestine less stable than TAF and is rapidly metabolized by gut hydrolases.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Seznam zkratk  | 8  |
| 2. Úvod   | 11 |
| 3. Teoretická část  | 13 |
| 3.1 Tenofovir   | 13 |
| 3.1.1 Základní charakteristika tenofoviru, mechanismus účinku a indikace                        | 13 |
| 3.1.2. Tenofovir disoproxil fumarát a tenofovir alefenamid fumarát                              | 15 |
| 3.2. Střevní bariéra, absorpce léčiv ve střevě  | 18 |
| 3.2.1. Složky střevní bariéry   | 18 |
| 3.2.2. Mechanismy absorpce léčiv v tenkém střevě  | 19 |
| 3.3. ATP-vázající membránové transportéry   | 22 |
| 3.3.1. Efluxní ABC transportéry   | 22 |
| 3.3.2. ABCB1  | 23 |
| 3.3.3. ABCG2  | 25 |
| 3.3.4. Lékové interakce na ABC transportérech   | 28 |
| 3.4. Studium absorpce léčiv ve střevě – <i>in vitro</i> a <i>ex vivo</i> modely střevní bariéry | 29 |
| 3.4.2. <i>Ex vivo</i> modely střevní bariéry  | 30 |
| 4. Hypotéza a cíl práce   | 33 |
| 5. Experimentální část  | 34 |
| 5.1. Studie na buněčných liniích Caco-2   | 34 |
| 5.1.1. Materiál   | 34 |
| 5.1.2. Transport přes monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2                                 | 35 |
| 5.1.3. Postup   | 37 |
| 5.2. Inkubace rPCIS   | 38 |
| 5.2.1. Materiál   | 38 |
| 5.2.2. Princip metody   | 38 |
| 5.2.3. Postup   | 39 |
| 5.3. Statistická analýza  | 40 |
| 6. Výsledky   | 41 |
| 6.1. Obousměrný transport TDF a TAF přes Caco-2 monovrstvu                                      | 41 |
| 6.2. Akumulační studie s TDF a TAF na rPCIS   | 43 |
| 6.2.1. Studium stability TDF a TAF v přítomnosti rPCIS  | 43 |
| 6.2.2. Vliv inhibice ABCB1 na akumulaci TDF/TAF v rPCIS   | 44 |
| 6.2.3. Efekt sofosbuviru na stabilitu a akumulaci TDF a jeho metabolitů v rPCIS                 | 46 |
| 7. Diskuze  | 49 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 8. Závěr .....            | 53 |
| 9. Literární zdroje ..... | 54 |

## 1. Seznam zkratek

|                  |  |
|------------------|--|
| ABC transportéry | ATP-binding cassette transportéry  |
| ABCB1            | P-glykoprotein (P-gp), zástupce ABCB podrodiny ABC transportérů  |
| ABCC1,2,3,4,6    | Multidrug resistance-associated protein (MRP 1,2,3,4,6)  |
| ABCG2            | Breast cancer resistance protein (BCRP)  |
| AIDS             | syndrom získaného imunodeficitu (Acquired immune deficiency syndrome)  |
| Caco-2           | buňky lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu   |
| cART             | kombinovaná antiretrovirální terapie   |
| CP100356         | modelový inhibitor ABCB1   |
| CYP              | cytochrom P450, hlavní enzym podílející se na první fázi biotransformace xenobiotik                                    |
| CYP3A4           | zástupce rodiny 3 cytochromu P450  |
| DAA              | přímo působící antivirotika (Direct acting antivirals)   |
| DMEM             | Dulbecco's modified eagle medium   |
| DMSO             | dimethylsulfoxid   |
| ER               | efluxní poměr (efflux ratio), charakterizovaný jako poměr $P_{app}$ ve směru BA a $P_{app}$ ve směru AB ( $rP_{app}$ ) |
| FBS              | fetální bovinní sérum  |
| HBSS             | Hank's balanced salt solution  |
| HBV              | virus hepatitidy B   |
| HEPES            | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina  |
| HIV              | virus lidské imunodeficiency (Human immunodeficiency virus)  |



|              |  |
|--------------|--|
| HPLC         | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)                      |
| Ko143        | modelový inhibitor ABCG2   |
| Ly335979     | zosuquidar, inhibitor ABCB1 transportéru   |
| MRK16, MRK17 | anti-ABCB1 monoklonální protilátky   |
| MsOH         | metansulfonová kyselina  |
| NBD          | nukleotid vázající doména (nucleotid binding domain) ABC transportérů                                |
| NEAA         | neesenciální aminokyseliny (non-essential aminoacids)  |
| NNRTI        | nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy   |
| NRTI         | nukleotidové/nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy  |
| NS5B         | polymeráza viru hepatitidy C (non-structural protein 5B)   |
| OAT          | transportéry organických aniontů (Organic anion transporters)  |
| $P_{app}$    | koeficient permeability, charakterizuje transport léčiva přes monovrstvu polarizovaných Caco-2 buněk |
| PBS          | fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)   |
| PCIS         | ultratenké střešní řezy (Precision-cut intestinal slices)  |
| PCTS         | ultratenké tkáňové řezy (Precision-cut tissue slices)  |
| PEPT 1       | peptidový transportér 1 (Peptide transporter 1)  |
| PIs          | inhibitory proteázy  |
| P/S          | penicilin/streptomycin   |
| rPCIS        | ultratenké řezy střeva potkana (rat Precision-cut intestinal slices)                                 |
| SD           | směrodatná odchylka  |
| SOF          | sofosbuvir   |
| TAF          | tenofovir alafenamid fumarát   |

|        |   |
|--------|---|
| TDF    | tenofovir disoproxil fumarát              |
| TEM    | tenofovir monoester                       |
| TEER   | transepiteliální elektrický odpor         |
| TFV    | tenofovir                                 |
| TFV-DP | tenofovir-difosfát                        |
| TMD    | transmembránové domény ABC transportérů   |
| WME    | William's medium E containing L-glutamine |

## 2. Úvod

Infekce virem HIV (virus lidské imunodeficiency) je závažným globálním problémem. Touto infekcí se doposud celosvětově nakazilo 76 milionů lidí, z čehož 33 milionů na následky rozvoje AIDS (Acquired immune deficiency syndrome) zemřelo. Kontinentem, který je HIV infekcí nejvíce zasažen, je Afrika, kde tímto onemocněním trpí přibližně každý dvacátý pátý dospělý člověk (WHO 2020). Antiretrovirální terapie je v současné době indikována u všech pacientů s HIV infekcí. Počet pacientů léčených antiretrovirotiky byl na konci roku 2019 roven přibližně 25,4 milionům (WHO 2020).

Tenofovir (TFV) je acyklický nukleosid-monofosfát (analog deoxyadenosin-monofosfátu) patřící mezi antiretrovirotika ze skupiny nukleotidových inhibitorů reverzní transkriptázy (NRTI) viru HIV (Callebaut et al. 2015).

TFV působí jako inhibitor virových DNA polymeráz. Používá se v monoterapii infekce virem hepatitidy B (HBV) a v rámci kombinované antiretrovirální terapie (cART) infekce vyvolané virem HIV. Ta u pacientů s HIV infekcí výrazně snižuje morbiditu a mortalitu (Ray et al. 2016, Tang et al. 2020, WHO 2018).

TFV disponuje řadou výhodných vlastností. Mezi ně patří nízká aktivita jeho aktivního metabolitu tenofovir-difosfátu (TFV-DP) vůči lidským mitochondriálním DNA polymerázám nebo dlouhý plazmatický (17 hodin) a intracelulární ( $\geq 60$  hodin) biologický poločas. Zásadními problémy TFV jsou však jeho nízká biologická dostupnost po p.o. podání a jeho nízká *in vitro* antiretrovirální aktivita limitovaná nízkým průnikem do cílových buněk (z důvodu omezené schopnosti TFV procházet přes biologické membrány) (Birkus et al. 2015, Kearney et al. 2004, Ray et al. 2016).

Právě za účelem řešení problému se špatnou biodostupností po p.o. podání a prostupností TFV přes biologické membrány byla vyvinuta dvě proléčiva TFV, tenofovir disoproxil fumarát (TDF) a novější tenofovir alafenamid fumarát (TAF) (Birkus et al. 2015, Callebaut et al. 2015).

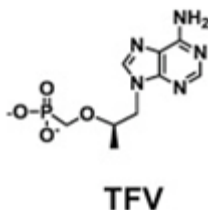
TDF je substrátem dvou nejvýznamnějších lékových transportérů z rodiny efluxních ABC (ATP-binding cassette) transportérů, P-glykoproteinu (ABCB1, P-gp) a Breast cancer resistance proteinu (ABCG2, BCRP) (Neumanova et al. 2014). TAF je rovněž popsán jako substrát ABC transportérů, a to jak ABCB1, tak i ABCG2 (Begley et al. 2018, EMA 2015). ABCB1 a ABCG2 jsou významnými transportéry, které se

podílejí na presystémové eliminaci p.o. podaných léčiv, lze tedy předpokládat, že snižují biodostupnost TDF a TAF. Tato diplomová práce se zaměřuje na porovnání TDF a TAF z hlediska jejich vychytávání enterocyty, přestupu přes střevní bariéru a stability ve střevě pomocí *in vitro* a *ex vivo* modelů střevní bariéry, se zaměřením právě na roli ABCB1 a ABCG2.

## 3. Teoretická část

### 3.1 Tenofovir

#### 3.1.1 Základní charakteristika tenofoviru, mechanismus účinku a indikace



**Obrázek 1:** Struktura tenofoviru. Převzato a upraveno z: Ray et al. (2016).

TFV patří mezi antivirotika ze skupiny NRTI. Jedná se o acyklický nukleotidový analog deoxyadenosin-monofosfátu (Obrázek 1) (Callebaut et al. 2015), jež je lékem volby ve farmakoterapii HBV infekce u pacientů starších 12 let a jedním z léčiv první volby v cART HIV infekce a také v profylaxi HIV infekcí (Lampertico et al. 2017, Tang et al. 2020, WHO 2018). Léčba TFV je rovněž výhodná u pacientů s HIV/HBV koinfekcí, u nichž jsou jako léky volby zpravidla používány TFV spolu s lamivudinem (nebo emtricitabinem) a efavirenzem (AIDSinfo 2016). Aktivita TFV vůči HIV virům byla poprvé popsána v roce 1993 (Balzarini et al. 1993).

V léčbě HIV infekcí je TFV typicky používán v rámci takzvané cART, která je založena na použití tří antiretrovirotik spadajících minimálně do dvou rozdílných skupin. Zpravidla jsou používány dva NRTI (kromě TFV jsou doporučovány abakavir, lamivudin nebo emtricitabin) v kombinaci s nenukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy (NNRTI; například doravirin či rilpivirin) nebo inhibitorem proteázy (PIs; mezi doporučované patří darunavir, atazanavir a lopinavir), které jsou vždy podávány společně s ritonavirem nebo cobicistatem, které zvyšují biodostupnost a prodlužují plasmatický poločas uvedených PIs. Ekvivalentní alternativou PIs jsou inhibitory integrázy, například dolutegravir, raltegravir nebo elvitegravir (AIDSinfo 2016, Tseng et al. 2017, WHO 2018).

Na aktivní formu TFV-DP je TFV konvertován ve virem napadených buňkách ve dvou krocích. První fosforylace probíhá pomocí AMP-kinázy a druhá prostřednictvím nukleosid difosfát-kinázy (Birkus et al. 2015).

Mechanismus účinku TFV-DP u HIV infekcí spočívá v kompetitivní inhibici HIV reverzní transkriptázy (TFV-DP soutěží s jejím fyziologickým substrátem dideoxyadenosin-trifosfátem) a inkorporaci do nově tvořeného řetězce deoxyribonukleové kyseliny, což vede k ukončení syntézy tohoto řetězce kvůli chybějící cukerné složce ve struktuře TFV (Suo a Johnson 1998). V případě HBV TFV-DP kompetitivně inhibuje HBV DNA polymerázu (Delaney et al. 2006). Navzdory širokému spektru aktivity TFV-DP vůči virovým DNA polymerázám je afinita této aktivní látky k lidským polymerázám zanedbatelná, což je důvodem obecně nízké toxicity TFV (Brunton et al. 2018).

Přes obvykle dobrou toleranci TFV se u některých pacientů mohou objevit nežádoucí účinky. Mezi nejčastější patří asténie (tělesná slabost), nevolnost a zvracení, nadýmání, bolesti břicha a průjem. Dalšími nežádoucími účinky, které se u pacientů léčených TFV mohou objevit jsou laktátová acidóza, zhoršení renálních funkcí až renální selhání a/nebo snížení kostní denzity a s tím související zvýšené riziko fraktur u predisponovaných pacientů (Brunton et al. 2018, Cihlar et al. 2002, Chapman et al. 2003, Kearney et al. 2004, Ray et al. 2016).

Mechanismus nefrotoxického působení TFV doposud nebyl zcela objasněn. Předpokládá se ale, že souvisí s toxickým působením na mitochondrie buněk proximálních renálních tubulů, do jejichž intracelulárního prostoru je TFV transportován pomocí transportérů pro organické anionty (OAT) (Cihlar et al. 2001, Kichloo et al. 2019). Z jejich intracelulárního prostoru je TFV následně vylučován do lumen tubulů efluxním Multidrug resistance-associated protein 4 (ABCC4, MRP4) transportérem, lokalizovaným na apikální membráně buněk proximálních renálních tubulů (Ray et al. 2006). Eflux TFV zprostředkovaný ABCC4 je však v porovnání s jeho influxem OAT výrazně pomalejší, proto má TFV tendenci se v buňkách proximálních renálních tubulů kumulovat (Stray et al. 2013). Mezi dosud identifikované rizikové faktory nefrotoxicity TFV patří například vyšší věk, diabetes nebo renální onemocnění (Morlat et al. 2013). Zvýšené riziko nefrotoxicity TFV bylo rovněž pozorováno při jeho podávání

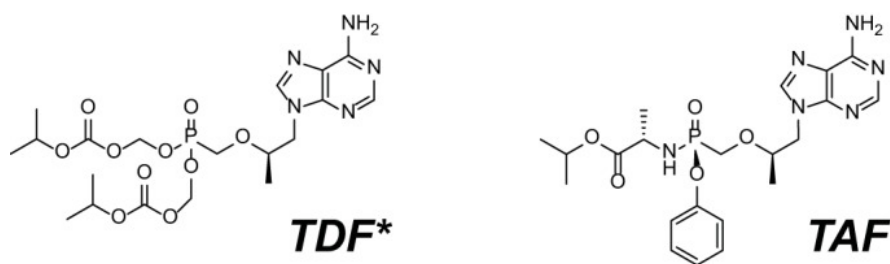
spolu s cobicistatem, který inhibuje ABCC4 zprostředkovaný eflux TFV (Stray et al. 2013).

Problémem TFV je jeho velmi omezená schopnost pronikat přes biologické membrány a s ní související nízká biodostupnost po p.o. podání. Příčinou limitované prostupnosti TFV přes fosfolipidové membrány je přítomnost dvou negativních nábojů fosfátového zbytku (Callebaut et al. 2015, Ray et al. 2016). Pro zvýšení p.o. biodostupnosti je TFV podáván ve formě prolečiv, TDF nebo TAF (Birkus et al. 2015). Biodostupnost TFV je při podání obvyklé denní terapeutické dávky 300 mg TDF na lačno okolo 25 % (Barditch-Crovo et al. 2001). Potrava s vysokým obsahem tuku zvyšuje biodostupnost TFV až na 40 % (Chapman et al. 2003). U p.o. podávaného TAF, při podání s tučným jídlem, dosahuje biodostupnost TAF až 65 % (Murínová 2019). TFV není v organismu významně metabolizován. V nezměněné formě je vylučován primárně ledvinami, a to glomerulární filtrací i aktivní tubulární sekrecí (Cihlar et al. 2001, Gallant a Deresinski 2003, Ray et al. 2006).

TFV není považován za léčivo s významným potenciálem k farmakokinetickým lékovým interakcím (není metabolizován cytochromem P450 (CYP), ani vůči němu nevykazuje inhibiční nebo indukční aktivitu). Avšak z důvodu jeho renální exkrece může dojít k zvýšení jeho plazmatických koncentracích v případě, že je podáván spolu s léčivy negativně ovlivňujícími renální funkce (Gallant a Deresinski 2003).

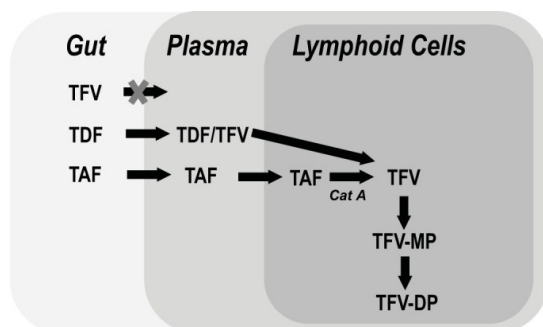
### 3.1.2. Tenofovir disoproxil fumarát a tenofovir alefenamid fumarát

Zvýšení biodostupnosti po perorálním podání je u TDF i TAF (Obrázek 2) dosahováno na základě maskování záporně nabytého fosfátu TFV lipofilními skupinami (Birkus et al. 2015, Callebaut et al. 2015).



**Obrázek 2:** Vzorec TDF a TAF (ve vzorci TDF ani TAF není vyobrazena fumarátová sůl). Převzato a upraveno z: Callebaut et al. (2015).

TDF i TAF jsou po podání hydrolyzovány za uvolnění TFV. TDF se hydrolyzuje již v průběhu průchodu střevní bariérou a v krvi, TAF je oproti tomu mnohem stabilnější a k jeho hydrolyze dochází až intracelulárně, po vstupu do cílových buněk (Obrázek 3), kde zásadní roli při jeho hydrolyze hraje lyosomální serinová proteáza katepsin A (Birkus et al. 2015, Callebaut et al. 2015, Lee et al. 2005, Moss et al. 2017).



**Obrázek 3:** Schéma konverze TDF a TAF na aktivní formu TFV-DP. Převzato a upraveno z: Callebaut et al. (2015).

TAF se v porovnání s TDF ukazuje jako klinicky účinnější, což souvisí s dosahováním vyšších koncentrací aktivní formy TFV, tedy TFV-DP, v cílových buňkách (Markowitz et al. 2014, Ruane et al. 2013). Díky vyšší klinické účinnosti mohou být u TAF, v porovnání s TDF, podávány pacientům nižší dávky. Zatímco doporučená denní dávka TDF pro dospělého člověka je 300 mg, u TAF je pouhých 25 mg. Pokud je ovšem TAF podán v kombinaci s ritonavirem nebo cobicistatem, dávku lze snížit na 10 mg (Ruane et al. 2013, Zack et al. 2015). Podávání TAF vede k až o 91 % nižším systémovým koncentracím TFV v porovnání s podáním ekvivalentní dávky TDF. Při zachování srovnatelné účinnosti tak dochází k redukci systémových nežádoucích účinků TFV (u pacientů léčených TAF byly v porovnání s pacienty léčenými TDF pozorovány méně výrazný negativní vliv na kostní denzitu a také nižší riziko renálních nežádoucích účinků) (Gupta et al. 2019, Chan et al. 2016, Imaz a Podzamczer 2017, Ruane et al. 2013).

Menší toxicita TAF nesouvisí ovšem pouze s nižšími plazmatickými koncentracemi TFV. Například nižší nefrotoxicita TAF je pravděpodobně ovlivněna i skutečností, že TAF, na rozdíl od TFV, není substrátem OAT1 a OAT3, a nedochází tak k jeho kumulaci v buňkách proximálních tubulů ledvin (EMA 2015).

TDF a TAF se také liší v celé řadě svých farmakokinetických vlastností. Zatímco TFV vzniklý rychlou hydrolyzou TDF (Callebaut et al. 2015) je nevýznamně vázán



na plazmatické bílkoviny, TAF se na bílkoviny krevní plazmy váže z 80 % (Murínová 2019). Rozdílná je také jejich eliminace z organismu. TFV je vylučován primárně renálně (ze 70-80 %) (Fung et al. 2002), oproti tomu TAF je vylučován zejména hepatobiliární exkrecí (Gilead Sciences 2019, Murínová 2019).

## 3.2. Střevní bariéra, absorpce léčiv ve střevě

Tenké střevo je díky své obrovské a bohatě prokrvené absorpční ploše místem, kde dochází ke vstřebávání většiny nutrientů z potravy a rovněž i většiny perorálně podaných léčiv. Velikost absorpční plochy tenkého střeva dosahuje až 200 m<sup>2</sup>, a to díky uspořádání střevního epitelu v typické klky a mikroklky (Dostálek et al. 2006, König et al. 2016).

Úlohou tenkého střeva však není pouze zajištění absorpce živin, ale zároveň i ochrana organismu před proniknutím potenciálně nebezpečných mikroorganismů, toxinů či škodlivých xenobiotik z vnějšího prostředí do systémové cirkulace (König et al. 2016).

### 3.2.1. Složky střevní bariéry

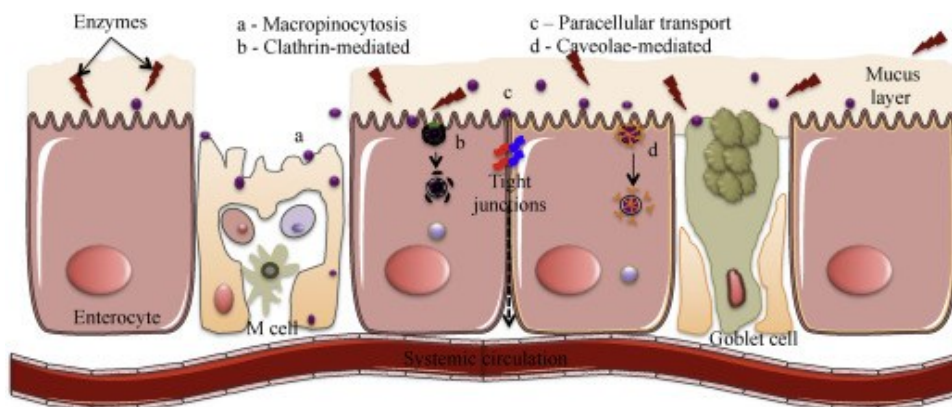
Základní složku střevní bariéry představuje střevní epitel, který je tvořený jednou vrstvou diferenciovaných specializovaných polarizovaných buněk (nasedajících na bazální membránu). Konkrétně se jedná o enterocyty (hlavní funkcí je absorpce), pohárkové buňky (jsou zodpovědné za produkci mucinu), enteroendokrinní buňky (produkující například cholecystokinin, gastrin, sekretin nebo glucagon-like peptide 1), Panethovy buňky (produkující antimikrobiální působky) a M buňky (antigen prezentující buňky, které fagocytují mikroorganismy nebo jiné antigeny a následně je transportují k pod nimi ležícím buňkám lymfatické tkáně). Jednotlivé enterocyty jsou vzájemně spojeny prostřednictvím těsných spojů (tight junctions) (Obrázek 4), které omezují paracelulární transport látek přes střevní stěnu (Ahlman a Nilsson 2001, Salvo-Romero et al. 2015, Thwala et al. 2018). Léčiva tak musí přecházet přes membránu buněk střevní bariéry. Pasivní difuzí však přes membrány enterocytů prostupují pouze lipofilní léčiva. Vysoce hydrofilní nebo ionizované sloučeniny jsou přes ně přenášeny pomocí specifických transportérů (Dostálek et al. 2006).

Důležitou součástí intestinální bariéry je rovněž hlenová vrstva kryjící epiteliální buňky, která zabraňuje adhezi bakterií ke střevní stěně. Právě tato mukózní vrstva je první vrstvou střevní bariéry, se kterou přicházejí potenciálně škodlivé mikroorganismy po vstupu do střevního lumen do kontaktu a která zabraňuje jejich přímému kontaktu se střevním epitelem (Camilleri et al. 2012, Vancamelbeke a Vermeire 2017).

Za součást intestinální bariéry, omezující absorpci xenobiotik ve střevě, lze dále považovat i biotransformační enzymy lokalizované buď přímo uvnitř enterocytů, nebo na jejich povrchu. Tyto enzymy mohou způsobovat degradaci léčiva již ve střevě, ještě před jeho vstupem do systémové cirkulace (Kaminsky a Zhang 2003). Mezi enzymy lokalizované na membránách enterocytů patří například alkalická fosfatáza, která rozkládá proléčiva typu esterů kyseliny fosforečné (Yuan et al. 2009), nebo enzymy typu hydroláz, které mimo jiné hrají i roli v přeměně TDF na TFV už v lumen střeva (Callebaut et al. 2005, Hunter a Hirst 1997).

V cytosolu enterocytů jsou lokalizovány enzymy první i druhé fáze metabolismu xenobiotik. Nejvíce zastoupenými enzymy I. fáze jsou CYP, konkrétně izoforma CYP3A4 (zástupce rodiny 3 cytochromu P450), z enzymů II. fáze metabolismu má největší význam UDP-glukuronosyltransferáza (Dietrich et al. 2003, Hunter a Hirst 1997, Shi a Li 2014).

Významnou složkou střevní bariéry jsou také membránové transportéry. Ty se podílejí na absorpci nutrientů a ochraně organismu (Dietrich et al. 2003, Kaminsky a Zhang 2003).



**Obrázek 4:** Střevní bariéra. Převzato a upraveno z: Thwala et al. (2018).

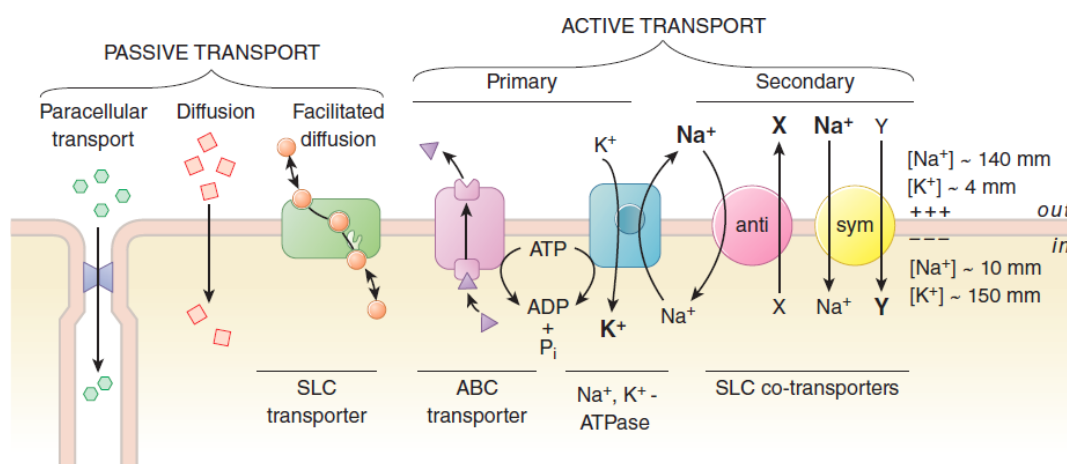
### 3.2.2. Mechanismy absorpce léčiv v tenkém střevě

Nejčastěji probíhá absorpce léčiv v tenkém střevě mechanismem pasivní difúze, při níž jsou léčiva transportována přes membránu ve směru koncentračního gradientu bez potřeby dodání energie (Dostálek et al. 2006, Martínková et al. 2018).

Pasivní difúzií prostupují lipofilní neionizovaná léčiva o nízké molekulové hmotnosti ( $\leq 150$  Da). V lumen tenkého střeva se hodnota pH pohybuje od hodnot 4 až 5 v jeho proximální části (duodenu) po hodnotu 8 v distálních segmentech. Tyto regionální rozdíly v pH mají značný vliv na míru absorpce léčiv charakteru slabých kyselin a zásad (Dostálek et al. 2006, Martínková et al. 2018, Švihovec et al. 2018).

Léčiva s větší molekulou a/nebo léčiva hydrofilní (včetně ionizovaných) pasivní difúzií přes membrány přecházet nemohou. V jejich transportu přes biologické bariéry tedy hrají zásadní roli transportéry (Obrázek 5). Rozeznáváme facilitovanou difúzi, kdy je léčivo obdobně jako u pasivní difúze transportováno po koncentračním spádu bez spotřeby energie, a aktivní transport, při němž je za současné spotřeby energie léčivo přenášeno proti koncentračnímu spádu. Kapacita transmembránového přestupu je omezena počtem přenašečů schopných transportovat dané léčivo, a je tedy satureovatelná (Dostálek et al. 2006, Švihovec et al. 2018).

Facilitovaná difúze se podílí hlavně na absorpci eubiotických substrátů a léčiv strukturně podobných endogenním molekulám. Například PEPT 1 transportér (peptidový transportér 1) zprostředkovává absorpci gabapentinu na základě jeho strukturální podobnosti s aminokyselinami (Nguyen et al. 2007, Skálová et al. 2017). Efluxní aktivní transportéry lokalizované v apikální membráně enterocytů mají naopak ochrannou funkci, která je zajištěna transportem substrátů z nitra enterocytů zpět do lumen střeva (Dietrich et al. 2003, Hunter a Hirst 1997, Chan et al. 2004). V současnosti nejstudovanější skupinou efluxních transportérů jsou ABC transportéry. Jejich nejvýznamnějšími zástupci ve střevě jsou ABCB1 a ABCG2 (DeGorter et al. 2012).



**Obrázek 5:** Mechanismy přestupu léčiv přes membrány a buněčné bariéry. Převzato a upraveno z: Brunton et al. (2018).

Dalším transportním mechanismem, který se při střevní absorpci léčiv může uplatňovat, je filtrace. Jedná se o typ paracelulárního transportu, při němž léčivo spolu s tekutinou, v níž je rozpuštěno, prochází membránovými póry. Hnací silou filtrace jsou rozdíly v hydrostatickém a koloidně-osmotickém tlaku. Takto mohou být absorbovány například nízkomolekulární cukry nebo močovina (Dostálek et al. 2006, Švihovec et al. 2018).

Při vstřebávání některých léčiv se může uplatňovat i vezikulární transport, tedy endocytóza následovaná transcytózou a exocytózou. Tento způsob střevní absorpce se týká například větších peptidů, proteinů nebo mikročástic (Camilleri et al. 2012, Dostálek et al. 2006).

### **3.3. ATP-vázající membránové transportéry**

Označení „ABC“ vychází ze zkratky pro „ATP-binding cassette“ a poukazuje na to, jak lékové přenašeče patřící do této rodiny získávají pro aktivní transport látek přes membránu energii – hydrolýzou adenosintrifosfátu na adenosindifosfát a fosfát. Jedná se tedy o primární aktivní transportéry (Dostálek et al. 2006, Skálová et al. 2017).

V současné době je známých 48 různých ABC transportérů, jež jsou dále, na základě podobnosti v aminokyselinových sekvencích, děleny do sedmi podrodin ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG. Nejlépe prozkoumanou ABC podrodinou je ABCB, do níž patří pravděpodobně nejznámější zástupce ABC transportérů vůbec, ABCB1 (Dostálek et al. 2006, Montanari a Ecker 2015).

Transportéry patřící do ABC rodiny jsou si vzájemně strukturně podobné. Jejich charakteristickým společným znakem je přítomnost nukleotid vázajících domén (NBD) a hydrofobních transmembránových domén (TMD), tvořených šesti až jedenácti šroubovicemi. Zatímco NBD jsou zodpovědné za vázání a štěpení adenosintrifosfátu (čímž zajišťují uvolnění energie potřebné pro transmembránový přenos substrátů), úkolem TMD je rozpoznávání substrátů. Podle počtu NBD a TMD domén můžeme ABC transportéry rozdělit na poloviční („half“) transportéry a celé („full“) transportéry. Zatímco celé transportéry, jako je například ABCB1, jsou tvořené minimálně dvěma sety NBD a TMD domén, poloviční transportéry mají jen po jedné NBD a jedné TMD doméně (Alam et al. 2016, Hyde et al. 1990, Montanari a Ecker 2015).

Co se týče lokalizace ABC transportérů, mohou být přítomny jak na apikální, tak na bazolaterální membráně buněk. Mezi apikálně lokalizované řadíme například ABCB1, ABCG2 nebo ABCC2 (Multidrug resistance-associated protein 2; MRP 2). Mezi bazolaterálně lokalizované patří například ABCC1, 3 či 6 (Multidrug resistance-associated protein 1, 3, 6; MRP 1, 3, 6) (Skálová et al. 2017).

#### **3.3.1. Efluxní ABC transportéry**

Efluxní ABC transportéry přenášejí své substráty přes membránu ve směru z intracelulárního prostoru do prostoru extracelulárního, a snižují tak intracelulární akumulaci těchto látek (DeGorter et al. 2012, Chan et al. 2004).

Funkce efluxních ABC transportérů spočívá v bránění neselektivnímu průniku potenciálně toxických xenobiotik (včetně léčiv) z vnějšího prostředí do organismu, omezení jejich distribuce a usnadnění exkrece (Švihovec et al. 2018). Mezi nejvýznamnější patří ABCB1, ABCG2 a ABCC2 (Dietrich et al. 2003).

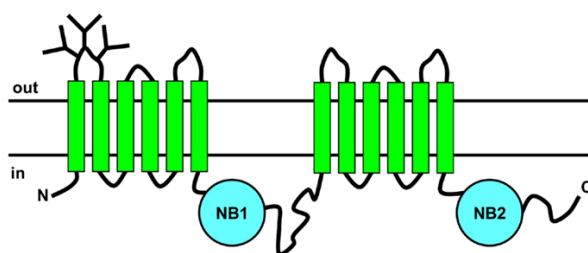
V současnosti jsou ABCB1, ABCG2 a ABCC1 intenzivně studovány zejména ve vztahu k mnohočetné lékové rezistenci nádorových onemocnění. Ta je charakterizována jako současná rezistence na strukturálně a funkčně odlišná léčiva, která není výsledkem nezávislých genetických mutací (Gottesman et al. 1995, Leslie et al. 2005).

### 3.3.2. ABCB1

#### Základní charakteristika ABCB1, jeho struktura a funkce

ABCB1 byl poprvé popsán již v roce 1976 (Juliano a Ling 1976). Jeho přítomnost byla od té doby prokázána u celé řady nejrůznějších organismů a v současné době je považován za nejdůležitější efluxní transportér ovlivňující farmakokinetiku léčiv (Dostálek et al. 2006, Skálová et al. 2017).

Jedná se o protein o molekulové hmotnosti 170 kDa. Je tvořen dvěma homologními polovinami, z nichž každá obsahuje jednu TMD skládající se z šesti alfa-šroubovic a jednu intracelulární NBD (Obrázek 6). Každá z těchto homologních polovin je tvořena 610 aminokyselinami, vzájemně je pak spojuje řetězec 60 aminokyselin (Gottesman a Pastan 1993, Jones a George 1998, Sharom 2014).



**Obrázek 6:** Struktura ABCB1 transportéru. Převzato a upraveno z: Sharom (2014).

U člověka jsou známy dva podtypy ABCB1 přenašeče, a to Pgp1 a Pgp3. Tyto dva subtypy ABCB1 se od sebe liší svou funkcí. Podtyp Pgp1 hraje roli v efluxním transportu látek, oproti tomu podtyp Pgp3 se uplatňuje při transportu fosfolipidů (Amin 2013, Dostálek et al. 2006).

ABCB1 se v lidském těle nachází v celé řadě různých tkání. Exprimují ho endotelové buňky v hematoencefalické bariéře a ovariích, Sertoliho buňky v hematotestikulární bariéře, trofoblast v placentě, renální tubuly, enterocyty v tenkém střevě, dále i hepatocyty či buňky žlučových cest, slinivky nebo dokonce i plic (Alam et al. 2016, Cascorbi 2011, Sankatsig et al. 2004). Fyziologická funkce tohoto transportéru doposud nebyla plně objasněna (Alam et al. 2016). Dodnes není například zcela jasné, jaký význam má tento transportér právě v plicích a pankreatu (Sankatsing et al. 2004), či snad, zda snížená funkce a exprese ABCB1 může mít souvislost se sníženou clearance neurotoxických peptidů (jako je například  $\beta$ -amyloid) z nervových buněk, což dále může představovat potenciální riziko pro rozvoj Alzheimerovy nemoci, Parkinsonovy nemoci a dalších neurologických poruch (Bartels 2012). Další dosud plně nepopsanou funkcí ABCB1 je sekrece mineralokortikoidů a glukokortikoidů z buněk kůry nadledvin (Ueda et al. 1992). Naopak, jeho jasně definovanou funkcí je ochrana organismu před toxickými substancemi. Z toho důvodu může být inhibice ABCB1 příčinou obecně zvýšené toxicity některých léčiv (Alam et al. 2016, Dietrich et al. 2003, Sankatsing et al. 2004). ABCB1 lokalizovaný na apikálních membránách enterocytů ve stěně tenkého střeva může být také příčinou omezené absorpce perorálně podaných léčiv ze střeva (Gottesman a Pastan 1993).

### **Substráty ABCB1**

ABCB1 vykazuje širokou substrátovou specifitu. V současné době je známo několik set jeho exogenních a endogenních substrátů. Jeho substráty jsou převážně lipofilní vysokomolekulární látky. Většina z nich je bez náboje, některé však nesou kladný náboj (DeGorter et al. 2012, Chan et al. 2004, Skálová et al. 2017).

Z léčiv mezi jeho substráty patří například celá řada antivirotik, zahrnujících například TDF či PI atazanavir (Cervený et al. 2018, Neumanova et al. 2014), a cytostatik (například vinka alkaloidy, antracykliny, podofylotoxiny nebo paklitaxel) (Hendrikx et al. 2013, Hunter a Hirst 1997), dále pak také léčiva ze skupiny antibiotik (erythromycin, klarithromycin, azithromycin nebo ciprofloxacin) (Lowes et al. 2002, Munić et al. 2010, Takano et al. 1998), kardiotonikum digoxin (Cavet et al. 1996), antidyslipidemika (například atorvastatin a lovastatin) (Chen et al. 2005), opioidní analgetika morfin a oxykodon (Chaves et al. 2017) nebo imunosupresiva cyklosporin A, sirolimus a takrolimus (Li et al. 2015, Lown et al. 1997). Endogenními substráty ABCB1



jsou steroidní hormony aldosteron, kortisol (Ueda et al. 1992) nebo ženské pohlavní hormony estradiol, estron a estriol (Kim a Benet 2004).

### **Inhibitory ABCB1**

Mezi významné inhibitory ABCB1 patří například antivykotikum ketokonazol (Achira et al. 1999), nedyhidropyridinové blokátory kalciových kanálů verapamil a diltiazem (Tsuruo et al. 1981, Tsuruo et al. 1983), antidysrytmika amiodaron a propafenon (Bachmakov et al. 2005, Chauffert et al. 1986), antibiotika erythromycin a klarithromycin (Munić et al. 2010), imunosupresivum cyklosporin A (Twentyman et al. 1987) či antivirotika sachinavir a ritonavir (Gutmann et al. 1999). Řada z těchto inhibitorů ABCB1 je zároveň sama jeho substrátem (Dietrich et al. 2003).

Zatímco estrogény jsou transportovány ABCB1, progesteron působí spíše jako jeho inhibitor (Ichikawa-Haraguchi et al. 1993, Ueda et al. 1992).

Inhibice ABCB1 může být v klinické praxi záměrně využíváno za účelem zvýšení biodostupnosti daného léčiva, zvýšení uptaku léčiva do cílové tkáně či za účelem zvýšení účinnosti chemoterapie nádorových onemocnění (Amin 2013, Sankatsing et al. 2004).

### **3.3.3. ABCG2**

#### **Základní charakteristika ABCG2, jeho struktura a funkce**

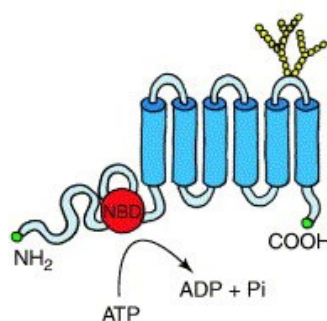
Dalším významným zástupcem rodiny ABC transportérů je ABCG2, pro nějž se též vžila zkratka BCRP (odvozená od „Breast cancer resistance protein“). Poprvé byl tento transportér izolován právě z karcinomu prsu s mnohočetnou lékovou rezistencí (Austin Doyle et al. 1998, van Herwaarden a Schinkel 2006).

Jeho lokalizace a funkce v lidském těle jsou obdobné jako v případě ABCB1. ABCG2 transportér exprimovaný hepatocyty se podílí na eliminaci léčiv a produktů metabolismu do žluči. Rovněž je lokalizován v endotelových buňkách hematoencefalické bariéry a syncytiotrofoblastu, kde společně s ABCB1 přispívá k ochraně centrální nervové soustavy a vyvíjejícího se plodu před možným poškozením toxickými xenobiotiky (včetně některých léčiv). Také ho nalezneme na apikální membráně enterocytů v tenkém střevě, kde zasahuje do absorpce celé řady léčiv a může zásadně snižovat jejich biodostupnost. Dále je pak tento transportér lokalizován například na membránách buněk

proximálních renálních tubulů (Mao 2008, Mao a Unadkat 2015, van Herwaarden a Schinkel 2006).

Obdobně jako ABCB1, i ABCG2 brání přenosu  $\beta$ -amyloidu z krve do mozku, a tak částečně brání rozvoji Alzheimerovy choroby (Xiong et al. 2009).

ABCG2 je složený z 655 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost se pohybuje přibližně okolo 72 kDa. Tvoří ho šest transmembránových jednotek a jedna NBD (lokalizovaná v blízkosti N-konce polypeptidového řetězce) (Obrázek 7). Z tohoto důvodu je označován jako „poloviční transportér“. Aby byl plně funkční, vyžaduje dimerizaci dvou ABCG2 proteinů (Alam et al. 2016, Natarajan et al. 2012).



**Obrázek 7:** Struktura ABCG2 transportéru. Převzato a upraveno z: van Herwaarden a Schinkel (2006).

Nedávno provedené studie rovněž poukazují na možnost spojování jednotlivých ABCG2 homodimerů do plně funkčních tetramerních komplexů tvořených čtyřmi ABCG2 homodimery (McDevitt et al. 2006).

### Substráty ABCG2

Zatímco ABCB1 přenáší především nezměněné lipofilní molekuly, substráty ABCG2 mohou být jak hydrofobní, tak i hydrofilní sloučeniny, a to jak nekongugované, tak i kongugované (Mao 2008). ABCG2 se podílí na transportu celé řady léčiv včetně atiretrovirotik lamivudinu, zidovudinu, abakaviru a TDF (Neumanova et al. 2014, Pan et al. 2007, Wang et al. 2003) či cytostatik mitoxantronu, metotrexátu, kamptotecinových derivátů (topotekanu a irinotekanu), antracyklinů (daunorubicinu a doxorubicinu) (Breedveld et al. 2004, Doyle a Ross 2003, Maliepaard et al. 2001) a inhibitorů tyrosinkináz (například imatinibu) (Breedveld et al. 2005). Kvůli efluxnímu transportu cytostatik je ABCG2 transportér, obdobně jako ABCB1, spojován s mnohočetnou

lékovou rezistencí celé řady nádorových onemocnění. Míra jeho exprese nádorovými buňkami zásadně ovlivňuje odpověď na léčbu a do značné míry určuje prognózu pacientů (Doyle a Ross 2003, Lemos et al. 2008, Mao a Unadkat 2015, Natarajan et al. 2012).

Kromě cytostatik a antivirotik patří mezi substráty tohoto transportéru i léčiva z dalších farmakologických skupin. Například se jedná o hypolipidemikum rosuvastatin (Kitamura et al. 2008), pantoprazol (Breedveld et al. 2004), cimetidin (Pavek et al. 2005) nebo antibiotikum nitrofurantoin (Merino et al. 2005) a chinolonová antibiotika ciprofloxacin, norfloxacin a ofloxacin (Merino et al. 2006). Mnohá z léčiv, která jsou substrátem ABCG2 transportéru, jsou zároveň i substráty ABCB1. Takovými to duálními substráty ABCG2 a ABCB1 jsou pravděpodobně právě i TDF a TAF (Begley et al. 2018, Gilead Sciences 2019, Neumanova et al. 2014).

Substráty ABCG2 nejsou jen xenobiotika, tento transportér hraje roli i v transmembránovém přenosu řady endogenních sloučenin. Vůbec prvním identifikovaným endogenním substrátem tohoto transportéru byl hem (Jonker et al. 2002), dalšími jsou například endogenní foláty (především mono-, di- a tri-glutamáty kyseliny listové), estron-3-sulfát, 17 $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glukuronid) nebo kyselina močová. Jelikož ABCG2 transportér hraje důležitou roli v renální i extrarenální exkreci kyseliny močové (mimo jiné má zásadní význam i pro exkreci kyseliny močové ve střevě), je jeho dysfunkce jednou z příčin hyperurikémie a dny (Cleophas et al. 2017, Chen et al. 2003, Imai et al. 2003, Matsuo et al. 2014, Nakayama et al. 2011).

### **Inhibitory ABCG2**

Doposud byla identifikována celá řada chemicky odlišných inhibitorů ABCG2 transportéru. Za zmínku stojí například antivirotika ze skupiny PIs ritonavir, sachinavir, nelfinavir a lopinavir (Gupta et al. 2004, Weiss et al. 2007), azolová antimykotika ketokonazol, itrakonazol či flukonazol (Gupta et al. 2007), imunosupresiva cyklosporin A, sirolimus a takrolimus (Gupta et al. 2006) nebo blokátory kalciových kanálů nitrendipin, nikardipin a nimodipin (Zhang et al. 2005) nebo tyrosinkinázové inhibitory imatinib, gefitinib, erlotinib a lapatinib (Dai et al. 2008, Houghton et al. 2004, Özvegy-Laczka et al. 2004, Shi et al. 2007). Mnoho léčiv, která působí jako inhibitory ABCG2 transportéru, zároveň inhibují i ABCB1. Příkladem takovýchto duálních inhibitorů jsou již zmiňovaná léčiva ritonavir, imatinib či cyklosporin A (Mao a Unadkat 2015).

### 3.3.4. Lékové interakce na ABC transportérech

Lékové interakce lze obecně definovat jako změny v síle a trvání účinku léčiva zapříčiněné vlivem jiné látky (Martínková et al. 2018). K lékovým interakcím dochází mezi různými léky nebo mezi lékem a potravou (Drugs 2020).

Předmětem předkládané diplomové práce je interakce TDF a TAF s ABCB1 a ABCG2 transportéry, proto bude dále rozveden farmakokinetický typ lékových interakcí.

Farmakokinetické interakce jsou obecně příčinou změn v absorpci, distribuci, metabolismu nebo exkreci léčiv, což může mít za následek změny v jejich plazmatických koncentracích, a tedy i změny intenzity farmakologického účinku terapie (Drugs 2020). K významným farmakokinetickým lékovým interakcím může docházet na enzymech odpovědných za metabolismus léčiv a, jak je uvedeno výše, také na lékových transportérech, včetně ABCB1, ABCG2 či ABCC2 (Dietrich et al. 2003, Martínková et al. 2018). Farmakokinetické lékové interakce mohou mít buď negativní, nebo pozitivní efekt. Negativním důsledkem lékových interakcí může být mimo jiné nedostatečná účinnost léčby, zvýšené riziko nežádoucích účinků, intoxikace či úplné selhání terapie. Pozitivní lékové interakce jsou pak cíleně využívány v klinické praxi (Martínková et al. 2018). Jedním z příkladů cíleně aplikované farmakokinetické lékové interakce je využití ritonaviru nebo cobicistatu (obě látky jsou inhibitory CYP3A4 a také ABCB1 a ABCG2) pro zvýšení biodostupnosti léčiv a prodloužení plazmatického poločasu (Kappelhoff et al. 2005, Tseng et al. 2017).

Inhibice ABCB1 se rovněž využívá při řešení problému s mnohočetnou lékovou resistencí nádorových onemocnění. Pro tento účel byly dokonce vyvinuty specifické anti-ABCB1 monoklonální protilátky (například MRK16 a MRK17), které jsou schopny efektivně inhibovat tento efluxní transportér, a tím zvyšovat kumulaci cytostatika v nádorových buňkách (Amin 2013).

### **3.4. Studium absorpce léčiv ve střevě – *in vitro* a *ex vivo* modely střevní bariéry**

Absorpce léčiv a jejich biodostupnost jsou jedněmi z nejdůležitějších aspektů, které jsou hodnoceny při vývoji nových léčiv. Biodostupnost léčiv po p.o. podání je ovlivněna řadou faktorů, a to přeměnou podaného léčiva enzymy trávicích tekutin, jeho rozkladem bakteriemi střevní mikroflóry, metabolickou aktivitou jater a střev a v neposlední řadě také permeabilitou střevní bariéry pro dané léčivo. Prostupnost léčiv přes střevní bariéru má tedy (spolu s dalšími výše uvedenými faktory) zásadní vliv na to, jak velká frakce se z určité dávky p.o. podaných léčiv dostane do systémové cirkulace, a tudíž i na klinický účinek p.o. podávaných léčiv (Hunter a Hirst 1997, Luo et al. 2013).

Existuje celá řada různých typů metod studia absorpce léčiv ve střevě a přechodu léčiv přes střevní bariéru, které mohou být využívány. Jedná se o *in silico* metody (založené na počítačových a matematických modelech vycházejících z fyzikálně-chemických vlastností molekuly studovaného léčiva), *in vitro* metody (využívající převážně buněčné linie), *in situ* metody, *ex vivo* metody a *in vivo* metody (využívající zvířecí modely) (Antunes et al. 2013).

#### **3.4.1 *In vitro* modely střevní bariéry**

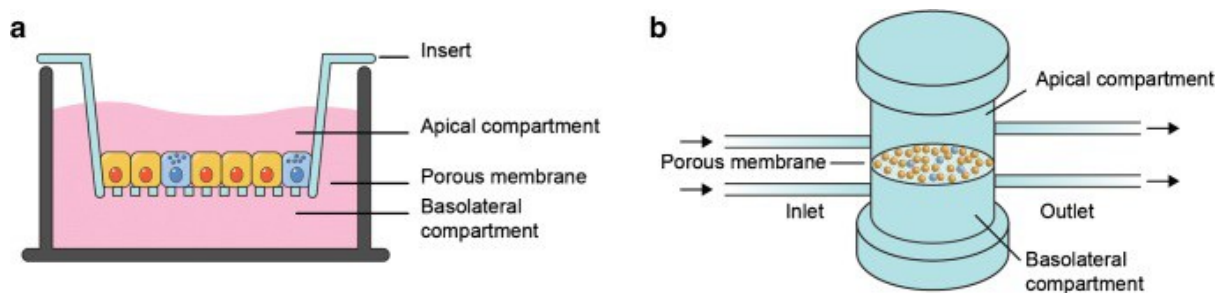
Význam *in vitro* metod v preklinických studiích absorpce léčiv v současné době stále vzrůstá. Jejich význam spočívá mimo jiné v možnosti omezit používání laboratorních zvířat (Schweinlin et al. 2017).

*In vitro* metody využívají jednoduché biologické nebo umělé membránové systémy (PAMPA neboli Paralell artificial membrane permeability assay) nebo monovrstvy kultivovaných buněčných linií. Využívány mohou být například Caco-2 buňky, HT29-MTX, TC-7 nebo MDCK buňky (Luo et al. 2013, van Breemen a Li 2005, Volpe et al. 2008).

Caco-2 jsou buňky odvozené od lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu. Využívají se jako model pro studium transcelulárního transportu, například pro studium absorpce léčiv a dalších sloučenin v lidském střevě (van Breemen a Li 2005). Při studiích transcelulárního transportu jsou Caco-2 buňky kultivovány na tzv. „Transwell

systemech“ (Obrázek 8), což jsou inzerty s porózní polykarbonátovou membránou, na nichž vytvářejí Caco-2 polarizovanou (lze u ní rozlišit apikální a bazolaterální stranu) monovrstvu buněk spojených pevnými spoji (Santbergen et al. 2020). Na apikální straně této buněčné monovrstvy jsou lokalizovány ABCB1, ABCG2 a ABCC2 (Volpe et al. 2008, Xia et al. 2005).

Kromě tradičních Transwell systémů se v současnosti využívají ještě takzvané dynamické průtokové Transwell systémy (Obrázek 8), v nichž jsou Caco-2 buňky kultivovány na kruhové porózní membráně oddělující dvě strany lineární trubice. Výhodami tohoto typu Transwell systému jsou mimo jiné nižší spotřeba kultivačního média a bioreagencií, lepší napodobení *in vivo* podmínek a možnost plné automatizace (v případě integrace s analytickým detekčním systémem) (Santbergen et al. 2020).



**Obrázek 8:** tradiční Transwell systém (a) a dynamický průtokový Transwell systém (b).  
Převzato a upraveno z: Santbergen et al. (2020)

Buňky lidského střevního epitelu připomíná polarizovaná monovrstva Caco-2 buněk v mnoha aspektech. Vytváří klky a mikrokilky, exprimuje transportní proteiny, včetně efluxních transportérů (mezi nimi i ABCB1), a řadu enzymů metabolizujících xenobiotika (van Breemen a Li 2005, Volpe et al. 2008).

### 3.4.2. *Ex vivo* modely střevní bariéry

*Ex vivo* metodami označujeme metody využívající části lidských nebo zvířecích tkání. Výhody spojené s používáním těchto metod jsou zejména zachování mezibuněčného kontaktu, přítomnost různých typů buněk a v neposlední řadě i přítomnost enzymů, kofaktorů a transportérů (Possidente et al. 2011).

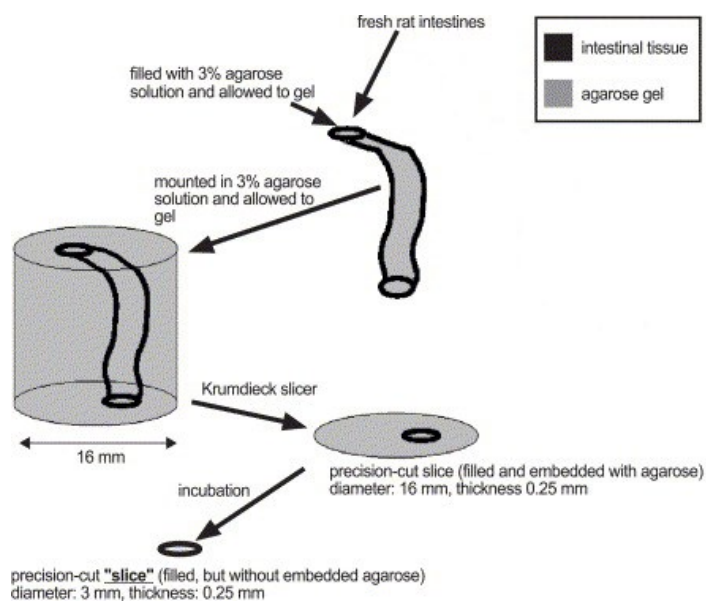
Mezi tyto metody lze zařadit například využití ultratenkých střevních řezů (PCIS; z anglického precision-cut intestinal slices) (Li et al. 2016).

## **Precision-cut intestinal slices**

PCIS patří mezi takzvané ultratenké tkáňové řezy (PCTS; z anglického precision-cut tissue slices), což jsou fragmenty tkáně s uniformní, přesně definovanou tloušťkou (de Graaf et al. 2010). Technika PCTS byla poprvé použita před více než 40 lety Carlosem Krumdieckem, který vynalezl poloautomatický kráječ, kterým vyřešil problém s nereprodukovatelnou tloušťkou ručně krájených řezů (Krumdieck et al. 1980), a ve spolupráci s Klausem Brendelem optimalizoval podmínky přípravy řezů tak, aby byla prodloužena jejich životnost (Brendel et al. 1987).

PCTS představují minimodel příslušného studovaného orgánu. Řezy obsahují všechny typy buněk dané tkáně, jsou v nich zachovány mezibuněčné interakce i interakce typu buňka-matrix (de Graaf et al. 2010). Původně byla technika PCTS vyžívána u orgánů typu játra a ledviny. Oproti tomu střeva se z důvodu jejich duté a měkké struktury zpočátku nejevila pro využití této techniky jako zcela vhodná (Groothuis a de Graaf 2013, Li et al. 2016). Prvními, kdo aplikovali tuto metodu u střeva, byli Ruben de Kanter a kolektiv (2005). Ti přišli s myšlenkou naplnění lumen střeva agarózou vytvářející gel při nízké teplotě, což usnadnilo krájení (Obrázek 9), a odstranění svrchní svalové vrstvy, čímž se zlepšil průnik kyslíku a příslušných substrátů ke všem buňkám řezu. Touto metodou získali PCIS kruhového tvaru o tloušťce pouhých 0,25 mm (de Kanter et al. 2005). Metoda PCIS se od té doby stala důležitým nástrojem pro studium absorpce a toxicity nových léčiv (Li et al. 2016) a také pro studium lékových interakcí sledujících zejména inhibici, ale i indukci lékových ABC transportérů, enzymů nebo nukleárních faktorů (de Graaf et al. 2007, Groothuis a de Graaf 2013, Possidente et al. 2011).

Výhodou PCIS je, že mohou být připravovány ze všech segmentů střeva, a to jak zvířecího, tak i lidského původu, což umožňuje sledování odlišné transportní a enzymatické aktivity v různých střevních segmentech a studium mezidruhových rozdílů (Groothuis a de Graaf 2013).



**Obrázek 9:** Metoda PCIS s využitím agarózy vytvářející gel při nízké teplotě. Převzato a upraveno z: de Kanter et al. (2005).



## 4. Hypotéza a cíl práce

V současnosti představují TDF a TAF farmakoterapii první volby v léčbě HIV infekce a chronické HBV infekce (Tang et al. 2020, WHO 2018). Jedná se v obou případech o proléčiva TFV. Obě léčiva jsou považována za substráty ABCB1 a ABCG2 (EMA 2015, Neumanova et al. 2014), a jelikož obě spadají dle biofarmaceutického klasifikačního systému do třídy 3 (jedná se tedy o látky s nízkou permeabilitou a vysokou rozpustností) (EMA 2015, FDA 2011), mohou efluxní transportéry významně ovlivnit jejich absorpci (Solvo Biotechnology n.d.).

Je známo, že TDF a TAF se vzájemně liší svou biodostupností po p.o. podání. Jejich přestup přes střevní bariéru a role střevních efluxních transportérů však doposud nebyly detailně popsány.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat TDF a TAF z hlediska jejich i) přestupu přes monovrstvu tvořenou Caco-2 buňkami, ii) stability ve střevě a kumulace v enterocytech pomocí ultratenkých řezů střeva potkana (rPCIS) a iii) vlivu ABCB1 a ABCG2 na jejich střevní absorpci.

## **5. Experimentální část**

### **5.1. Studie na buněčných liniích Caco-2**

#### **5.1.1. Materiál**

##### **Chemikálie a činidla**

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

FBS (fetální bovinní sérum) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

HBSS (Hank's balanced salt solution) (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (Carl ROTH; Karlsruhe, Německo)

Hovězí albumin (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

Ko143 (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

Ly335979 (zosoquidar) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

MsOH (metansulfonová kyselina) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

NaHCO<sub>3</sub> (Penta s.r.o.; Chrudim, CZ)

NEAA (neesenciální aminokyseliny) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

PBS (Phosphate buffered saline; fosfátový pufr) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

P/S (penicilin/streptomycin) (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

TAF (MedChemExpress; New Jersey, USA)

TDF (Gilead Sciences; Foster City, Kalifornie, USA)

TEM (tenofovir monoester) (Gilead Sciences; Foster City, Kalifornie, USA)

TFV (Gilead Sciences; Foster City, Kalifornie, USA)

Trypsin (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

## **Kultivace buněčné linie Caco-2**

Caco-2 buňky, získané z institutu ATCC (American Type Culture Collection), byly kultivovány v DMEM s vysokým obsahem glukózy s přidavkem 10 % FBS, 1 % NEAA a 1 % P/S při teplotě 37°C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. V den, kdy buňky dosáhly 80-90% konfluence byly rutinně pasážovány. Při každém pasážování bylo nejprve z kultivační láhve odsáto DMEM médium. Následně byly buňky omyty PBS, předem zahřátým na teplotu 37°C. Poté byl k buňkám přidán roztok trypsinu (10 µl/cm<sup>2</sup> povrchu dna kultivační lahve) a buňky v něm byly za podmínek 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubovány až do jejich uvolnění (cca 5 minut). Následně bylo k buňkám přidáno čerstvé předeštěté (37°C) DMEM médium (1 ml) a buňky v něm byly rozsuspendovány. Rozsuspendované buňky byly v poměru 1:5 přeneseny do nové kultivační láhve a doplněny předeštětým (37 °C) DMEM médiem.

Pro potřeby experimentu byly využívány buňky v rozmezí 5. až 25. pasáže. Tyto buňky byly nasazovány v počtu 300 000 buněk na porézní polykarbonátovou membránu (Transwell® Permeable Support, Corning Incorporated; Cat. No. 3401; 1,12 cm<sup>2</sup>; velikost póru 0,4 µm), na níž byly následně kultivovány při teplotě 37°C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 21 dnů.

### **5.1.2. Transport přes monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2**

Pro ověření substrátové afinity TDF a TAF k efluxním ABC transportérům byly použity transportní studie přes monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2. Tato metoda je založena na sledování přestupu léčiva (TDF/TAF) z donorového roztoku přes monovrstvu Caco-2 buněk do roztoku receiverového.

V případě sledování transportu léčiva ve směru z apikálního kompartmentu do kompartmentu bazolaterálního (směr AB) je donorový roztok obsahující příslušné léčivo pipetován do kompartmentu apikálního a receiverový roztok (obsahující albumin v koncentraci 1 %) do kompartmentu bazolaterálního. Pokud je sledován transport

ve směru z bazolaterálního kompartmentu do apikálního (směr BA), je donorový roztok pipetován do kompartmentu bazolaterálního a receiverový roztok do kompartmentu apikálního (Hubatsch et al. 2007).

Transport léčiva ve směru AB probíhá na základě pasivní difúze. Ve směru BA je léčivo transportováno rovněž pasivní difúzí, zároveň se ale, pokud je dané léčivo substrátem příslušných ABC transportérů, na jeho transportu v tomto směru podílí i aktivní transport zprostředkovaný efluxními ABC transportéry. Pokud je tedy léčivo substrátem efluxních ABC transportérů, jeho přestup přes polarizovanou monovrstvu Caco-2 buněk je (v případě, kdy do roztoků nejsou přidány inhibitory efluxních transportérů) mohutnější ve směru BA (Giacomini et al. 2010, Hubatsch et al. 2007, van Breemen a Li 2005).

V případě, kdy jsou do roztoků přidány inhibitory příslušných efluxních transportérů (v případě této diplomové práce byly využívány Ko143 a Ly335979), dochází k útlumu funkce těchto transportérů, a tudíž klesá míra transportu léčiva ve směru BA, zatímco transport ve směru AB roste (jelikož nedochází k zpětnému vypuzování léčiva prošlého přes buněčnou monovrstvu zpět z receiverového kompartmentu do donorového) (Giacomini et al. 2010).

Pokud zkoumané léčivo není substrátem příslušných ABC transportérů, dochází k jeho přestupu přes buněčnou monovrstvu jen na základě pasivní difúze a jeho transport ve směru AB i BA je tudíž vyrovnaný (Hubatsch et al. 2007).

Jednotlivá léčiva je v případě této metody možno charakterizovat takzvaným koeficientem permeability ( $P_{app}$ ), který se vypočítá jako:  $P_{app} = (dQ/dt) \times (1/(A \times C_0))$ , kde  $dQ/dt$  odpovídá množství transportovaného léčiva přes buněčnou monovrstvu za daný čas,  $A$  představuje povrch membrány, přes kterou probíhá transport a  $C_0$  je výchozí koncentrace analyzovaného léčiva v donorovém kompartmentu. Na základě vypočítaných  $P_{app}$  pro transport ve směru AB i BA lze následně určit takzvaný efluxní poměr (efflux ratio; ER,  $rP_{app}$ ), který se vypočítá jako poměr  $P_{app} BA/P_{app} AB$  (Hubatsch et al. 2007). Hodnota ER >2 naznačuje, že na transportu léčiva ve směru BA se kromě difúze podílí i aktivní transport mediovaný efluxními transportéry (Giacomini et al. 2010).

### 5.1.3. Postup

Těsně před zahájením experimentu byl na každé z jamek Transwellu změřen takzvaný TEER (transepiteliální elektrický odpor) pro ověření způsobilosti Transwellu s buněčnými monovrstvami k danému experimentu. Pro měření TEER byl použit Milli-Cell Electrical Resistance System (Milli-pore Corporation; Bedford, MA).

Následně bylo z Transwellu odsáto kultivační DMEM médium a buňky byly opláchnuty PBS (37°C). Pro oplach spodního kompartmentu bylo vždy použito 1,5ml PBS, pro horní kompartment 0,5ml PBS. Po odsátí PBS byly do jednotlivých kompartmentů Transwellu pipetovány preinkubační roztoky (37°C). Do spodních (bazolaterálních) kompartmentů byly pipetovány roztoky o pH 7,4, v objemu 1,5 ml na jednu jamku, do horních (apikálních) kompartmentů byly pipetovány roztoky o pH 6,5, a to v objemu 0,5 ml na jednu jamku. K úpravě pH roztoků byly použity HEPES a MsOH. Po napipetování preinkubačních roztoků byl Transwell vložen do inkubátoru, kde proběhla 30minutová preinkubace za podmínek teplota 37°C, atmosféra 5 % CO<sub>2</sub>. Preinkubace byla ukončena odsátím preinkubačních roztoků a do jednotlivých kompartmentů byly posléze pipetovány roztoky inkubační, tedy receiverové (obsahující albumin v 1% koncentraci) a donorové. Opět byla dodržena zásada pipetování roztoků o pH 7,4 v objemu 1,5 ml na jamku do bazolaterálních kompartmentů a roztoků o pH 6,5 v objemu 0,5 ml na jamku do apikálních kompartmentů. Poté proběhla 1hodinová inkubace (za totožných podmínek jako preinkubace). Po 1hodinové inkubaci byly z receiverových kompartmentů odebrány vzorky o objemu 200 µl pro následnou HPLC (High-performance liquid chromatography) analýzu, objemy v receiverových kompartmentech byly doplněny na původní hodnotu. Poté následovala další 1 hodina inkubace. V čase 2 hodiny od začátku inkubace byly z receiverových kompartmentů znovu odebrány vzorky o objemu 200 µl pro následnou analýzu. HPLC analýza odebraných vzorků probíhala na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

## 5.2. Inkubace rPCIS

### 5.2.1. Materiál

#### Chemikálie

Agaróza vytvářející gel při nízké teplotě (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

CP100356 (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

DMSO (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA)

Krebs-Henseleit buffer (roztok Krebs-Henseleit byl připraven podle de Graaf et al. (2010))

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)

SOF (sofosbuvir) (Scintila; Jihlava, Česká republika)

TAF (MedChemExpress; New Jersey, USA)

TDF (Gilead Sciences; Foster City, Kalifornie, USA)

WME (William's medium E containing L-glutamine) (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA)

#### Laboratorní potkani

Pro experimenty byli použiti samci laboratorních potkanů Wistar získaní od společnosti Velaz (Praha, Česká republika) z chovu Charles river o váze 380 až 510 g. Chováni byli za standardních podmínek (cykly den/noc 12hodin/12 hodin, krmení a voda ad libitum). Usmrceni byli dislokací krční páteře (pro celkovou anestézii byl použit diethylether). rPCIS byly připravovány z potkaního jejunu.

### 5.2.2. Princip metody

rPCIS slouží jako *ex vivo* model střevní bariéry, který napodobuje buňky lidského střeva jak z hlediska exprimovaných efluxních transportérů, tak i z hlediska přítomnosti metabolizujících enzymů (de Graaf et al. 2010, Groothuis a de Graaf 2013, Possidente

et al. 2011). Díky tomu mohly být transportní studie na rPCIS využity nejen pro sledování vlivu inhibice efluxních transportérů na transport TDF a TAF a na jejich akumulaci v enterocytech, ale i pro hodnocení rychlosti metabolizace TDF a TAF enzymy lokalizovanými ve střevě a jejich stability ve střevě.

V případě studií zaměřených na metabolizaci TDF a TAF a jejich stabilitu ve střevě byly v definovaných časových intervalech odebrány vzorky z roztoků inkubovaných s rPCIS a z kontrolních roztoků (bez rPCIS, připravených totožným způsobem). Následně byly porovnávány koncentrace parentních léčiv (TDF/TAF) a jejich metabolitů ve vzorcích inkubovaných s rPCIS s jejich koncentracemi v kontrolních roztocích. V případě, kdy je parentní léčivo metabolizováno enzymy exprimovanými enterocyty, lze očekávat, že jeho rozklad na metabolity bude ve vzorku inkubovaném s rPCIS rychlejší než jeho spontánní rozklad v kontrolním roztoku. V takovém případě by tedy ve vzorku inkubovaném s rPCIS měly být zjištěny nižší koncentrace parentního léčiva, a naopak vyšší koncentrace jeho metabolitů než v kontrolním roztoku.

U akumulačních studií byla hodnocena koncentrace TDF/TAF v buňkách rPCIS v definovaných časových intervalech (koncentrace léčiva byla vztažena na 1 mg proteinu řezu). Akumulaci léčiv v enterocytech mohou výrazně snižovat efluxní transportéry vypuzující molekuly léčiv prošlých do nitra enterocytů zpět do lumen střeva. Z tohoto důvodu lze očekávat, že pokud je dané léčivo substrátem efluxních transportérů, bude jeho akumulace v rPCIS vyšší v případech, kdy budou do inkubačních (a preinkubačních) roztoků přidány specifické inhibitory těchto transportérů, než v případech, kdy inhibitory použity nebudou.

### **5.2.3. Postup**

rPCIS byly připraveny podle de Graaf et al. (2010), střevo bylo po vyjmutí z potkana vloženo do roztoku Krebs-Henseleit (chlazeného na teplotu 4°C, nasyceného kyslíkem), byla z něj odstraněna svrchní svalová vrstva a jeho lumen bylo vyplněno agarózou vytvářející gel při nízké teplotě. Ke krájení řezů (přibližně o tloušťce 250 μm) byl použit Krumdieck tissue slicer MD4000 (Alabama R&D; Munford, Alabama, USA).

Následovala 30minutová preinkubace řezů v preinkubačních roztocích obsahujících WME obohacené o glukózu v koncentraci 25 mM a případně modelové inhibitory

efluxních transportérů (CP100356). Preinkubace probíhala za podmínek objemy roztoků 0,5 ml, teplota 37°C, atmosféra 80 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>. Poté byly řezy přeneseny do roztoků inkubačních, které už obsahovaly příslušná antivirotika. Inkubace probíhala za totožných podmínek jako preinkubace. Ukončena byla vyjmutím řezů z inkubačních roztoků a jejich omytím 2x v 1 ml roztoku Krebs-Henseleit (chlazeného na teplotu 4°C, nasyceného kyslíkem). Zastavení metabolické aktivity bylo zajištěno vložením do nádoby se suchým ledem.

Následně byly k řezům přidány skleněné kuličky (přibližně 300 mg ke každému řezu, průměr kuliček 1,25 až 1,65 mm; Carl Roth; Karlsruhe, Germany) a vnitřní standard pro HPLC analýzu (jako rozpouštědlo byl použit acetonitril) a řezy byly zhomogenizovány pomocí přístroje FastPrep24 5G (MP Biomedicals; Santa Ana, Kalifornie, USA; podmínky homogenizace byly rychlost 6,0 m/s, čas 45 sekund, opakování 2x). Poté byla provedena centrifugace vzorků (podmínky centrifugace byly 10 000 otáček, doba centrifugace 10 minut).

Po centrifugaci byly ze supernatantu odebrány vzorky o objemu 100 µl pro následnou HPLC analýzu (HPLC analýza byla provedena na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovi v Hradci Králové). Po odebrání těchto 100 µl byly zhomogenizované vzorky vloženy do suchého inkubátoru (teplota 37°C), kde byly ponechány do odpaření zbytku rozpouštědla. Po odpaření rozpouštědla byly pelety rozpouštěny v 5M roztoku NaOH (objem 200 µM na jeden vzorek), ve kterém byly ponechány po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky zředěny vodou Milli-Q na koncentraci NaOH 1 M. V takto upravených vzorcích byl stanoven celkový protein pomocí soupravy Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific; Rockford, Illinois, USA).

### **5.3. Statistická analýza**

K vyhodnocení a grafickému zpracování dat byl použit program GraphPad Prism 9.0.2. (GraphPad Software, Inc; San Diego, Kalifornie, USA). Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr biologických či technických replikátů ± směrodatná odchylka (SD).

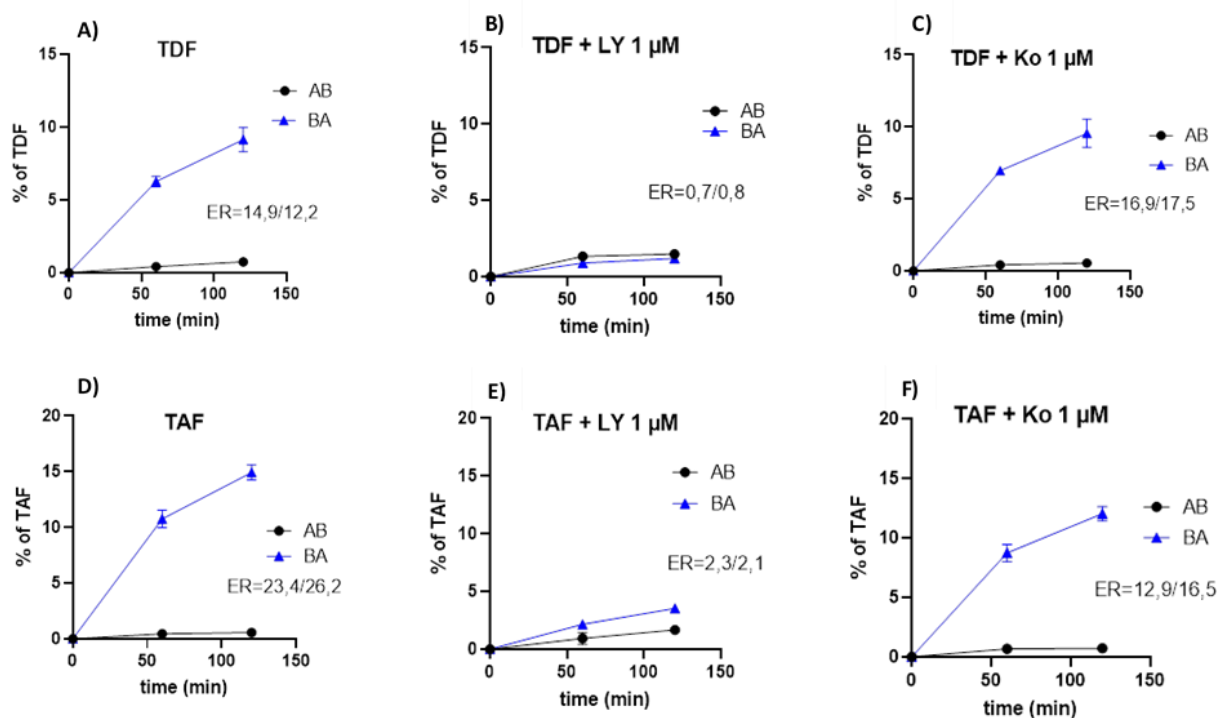
Statisticky byly hodnoceny pouze experimenty s  $n \geq 3$ ; a byl použit nepárový Studentův t-test. Za statisticky signifikantní jsou považovány hodnoty, při nichž  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) a  $p > 0,05$  (ns).



## 6. Výsledky

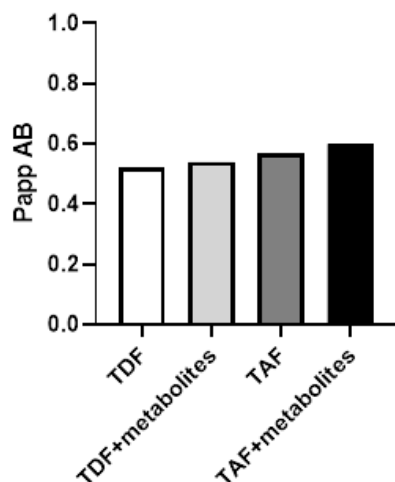
### 6.1. Obousměrný transport TDF a TAF přes Caco-2 monovrstvu

Prvním krokem experimentálního řešení diplomové práce bylo ověření, zda střevní ABCB1 a ABCG2 mohou ovlivnit absorpci TDF a TAF. Provedli jsme tedy transportní studie přes monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2, bez a v přítomnosti modelových inhibitorů ABCB1 (Ly335979) a ABCG2 transportéru (Ko143). TDF a TAF byly testovány při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . ER pro TDF byly 14,9 (po 60 min) a 12,2 (po 120 min) (Obrázek 10A) a pro TAF byly 23,4 (po 60 min) a 26,2 (po 120 min) (Obrázek 10D), což poukazuje na zapojení aktivního transportéru v přestupu testovaných látek přes buněčnou monovrstvu. V přítomnosti Ly335979 (1  $\mu\text{M}$ ) hodnota ER poklesla v případě TDF na hodnotu 0,7 (po 60 min) a 0,8 (po 120 min) (Obrázek 10B) a u transportu TAF na hodnotu 2,3 (po 60 min) a 2,1 (po 120 min) (viz Obrázek 10E). Použití Ko143 (1  $\mu\text{M}$ ) hodnotu ER u transportu TDF (Obrázek 10C) a TAF (Obrázek 10F) nesnížilo. Nepozorovaný vliv inhibice ABCG2 může v tomto případě souviset s nízkou expresí ABCG2 transportéru Caco-2 buňkami (Xia et al. 2005).



**Obrázek 10:** Grafické znázornění AB a BA transportu TDF (A, B, C) a TAF (D, E, F), testovaných v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , přes buněčné monovrstvy Caco-2 buněk bez modelových inhibitorů efluxních transportérů (A, D), v přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1 (Ly335979, 1  $\mu\text{M}$ ) (B, E) a v přítomnosti modelového inhibitoru ABCG2 (Ko143, 1  $\mu\text{M}$ ) (C, F), ( $n = 1$ ). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD.

U TDF a TAF jsme dále porovnali jejich permeabilitu přes buněčnou monovrstvu Caco-2 buněk ve směru AB pomocí  $P_{\text{app}}$  AB v čase 60 minut (Obrázek 11). V případě TDF (bez metabolitů) byl  $P_{\text{app}}$  AB roven 0,52, u TDF v součtu s jeho metabolity (TEM a TFV) 0,54, u TAF (bez metabolitů) 0,57 a u TAF v součtu s jeho metabolitem (TFV) 0,60. Z hodnot, které jsme získali, se zdá, že permeabilita přes buněčnou monovrstvu Caco-2 buněk ve směru AB je mírně vyšší v případě TAF.

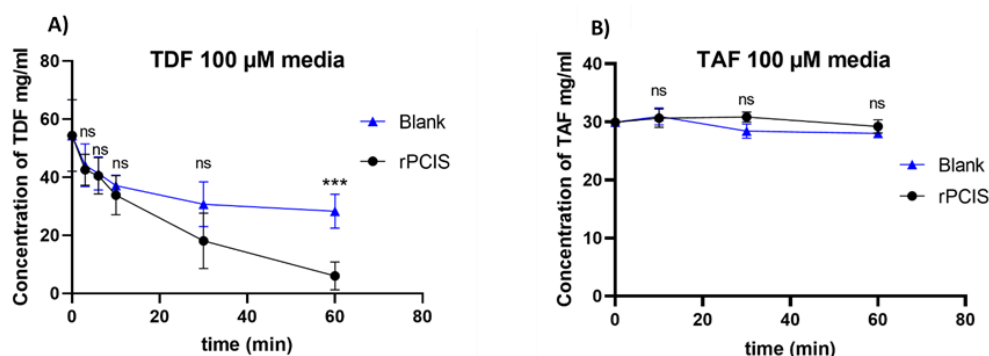


**Obrázek 11:** Grafické znázornění porovnání  $P_{app}$  AB v čase 60 min měřeného pro TDF, TDF a jeho metabolity, TAF, TAF a jeho metabolity ( $n = 1$ ). TDF i TAF byly testovány při koncentraci  $10 \mu\text{M}$ . Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD.

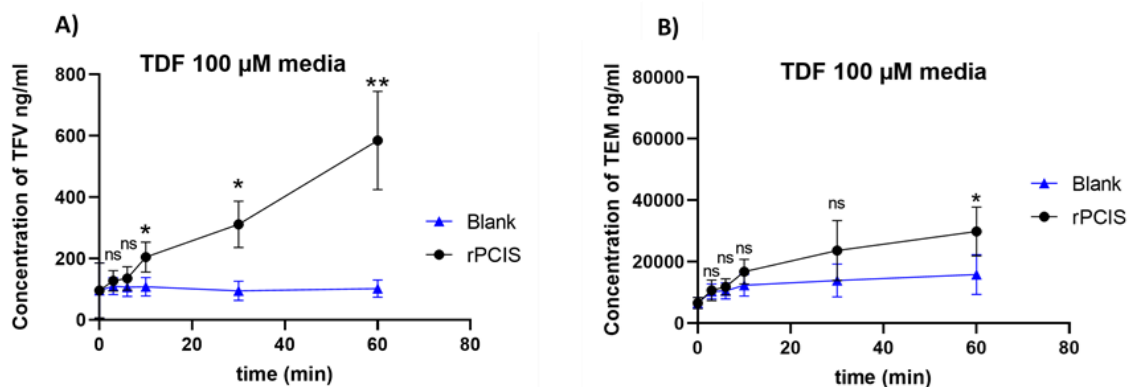
## 6.2. Akumulační studie s TDF a TAF na rPCIS

### 6.2.1. Studium stability TDF a TAF v přítomnosti rPCIS

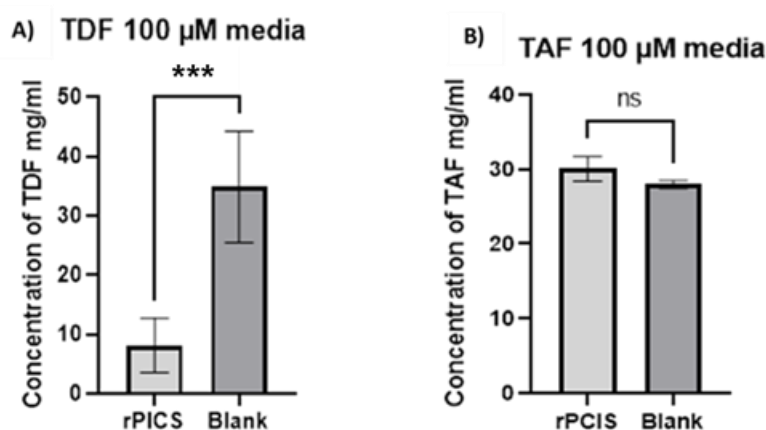
TDF i TAF byly testovány při koncentraci  $100 \mu\text{M}$ . TDF byl do jisté míry nestabilní i v samotném inkubačním médiu (bez přítomnosti rPCIS). Po 60 minutách byla změřena koncentrace přibližně na 50 % výchozí koncentrace TDF (z původních  $54,4 \text{ mg/ml}$  klesla na  $28,3 \text{ mg/ml}$ ). V přítomnosti rPCIS byla hydrolýza TDF významně urychlena. Po 60 minutách byla koncentrace TDF  $6,0 \text{ mg/l}$  (Obrázek 12A). Současně s poklesem koncentrace TDF byl pozorován nárůst koncentrace TFV a TEM (Obrázek 13A, B). U TAF nebyl rozdíl ve stabilitě mezi inkubací v médiu a médiu s rPCIS, k poklesu koncentrace v čase nedocházelo (Obrázek 12B).



**Obrázek 12:** Grafické znázornění stability TDF (A) ( $n=4$ ), TAF (B) ( $n=3$ ), testovaných v koncentraci  $100 \mu\text{M}$ , v přítomnosti rPCIS. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD. Pro zhodnocení statistické významnosti výsledků byl použit nepárový Studentův t-test.



**Obrázek 13:** Grafické znázornění nárůstu koncentrace metabolitů TDF, TFV (A) ( $n = 4$ ) a TEM (B) ( $n=3$ ), v médiu při inkubaci  $100\mu\text{M}$  TDF s rPCIS. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD. Pro zhodnocení statistické významnosti výsledků byl použit nepárový Studentův t-test.



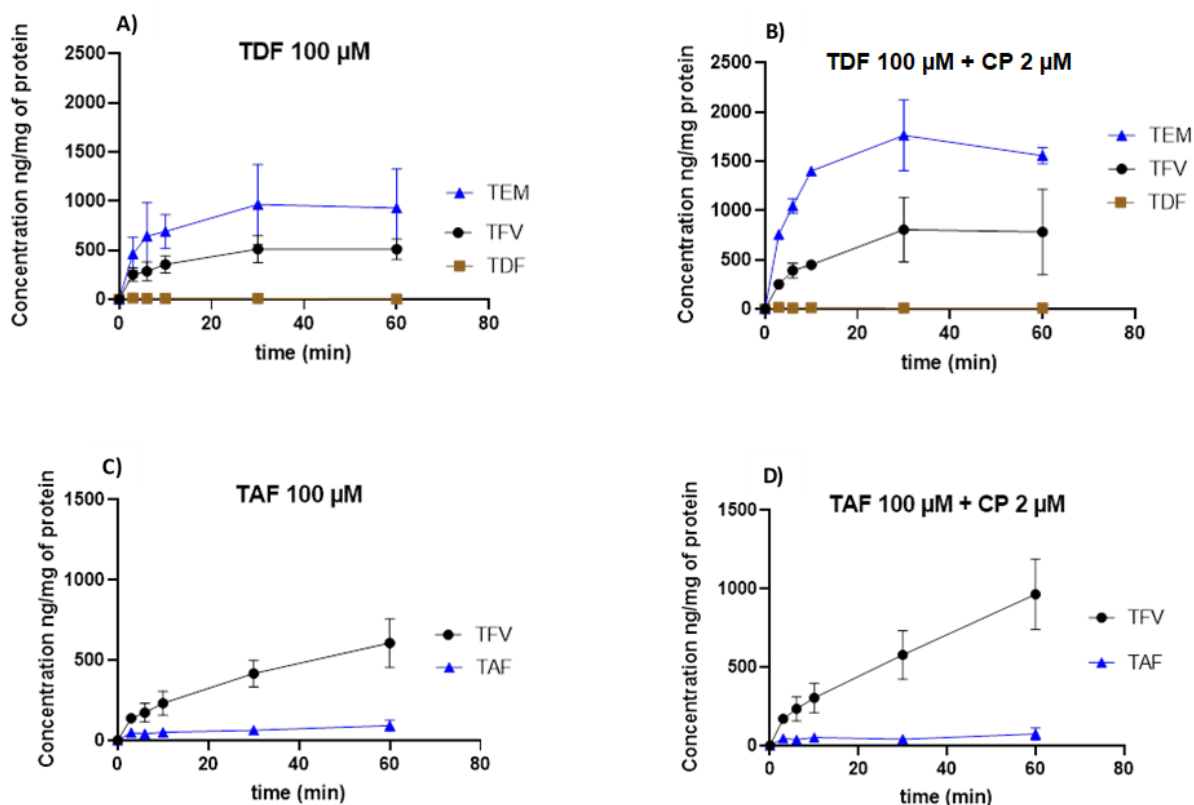
**Obrázek 14:** Grafické znázornění stability TDF (A) ( $n=7$ ), TAF (B) ( $n=3$ ), testovaných v koncentraci  $100\ \mu\text{M}$ , v přítomnosti rPCIS po 60minutové inkubaci. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD. Pro zhodnocení statistické významnosti výsledků byl použit nepárový Studentův t-test.

### 6.2.2. Vliv inhibice ABCB1 na akumulaci TDF/TAF v rPCIS

Při sledování akumulace TDF a TAF v rPCIS jsme předpokládali, že použití modelových inhibitorů ABCB1 jejich akumulaci v rPCIS zvýší. Testovali jsme TDF a TAF v koncentracích  $100\ \mu\text{M}$ . Jako modelový inhibitor efluxního transportéru ABCB1 byl použit CP100356 v koncentraci  $2\ \mu\text{M}$ . Po 60minutové inkubaci byla koncentrace TDF v rPCIS velmi nízká, v rozsahu přibližně 4 až 14 ng/mg proteinu. Nicméně jsme zaznamenali nárůst koncentrace metabolitů vzniklých hydrolýzou TDF, TFV

a TEM (Obrázek 15A). To je zřejmě důsledek rychlé hydrolyzy TDF v médiu a expozice rPCIS zvyšujícím se koncentracím TEM a TFV v průběhu inkubace.

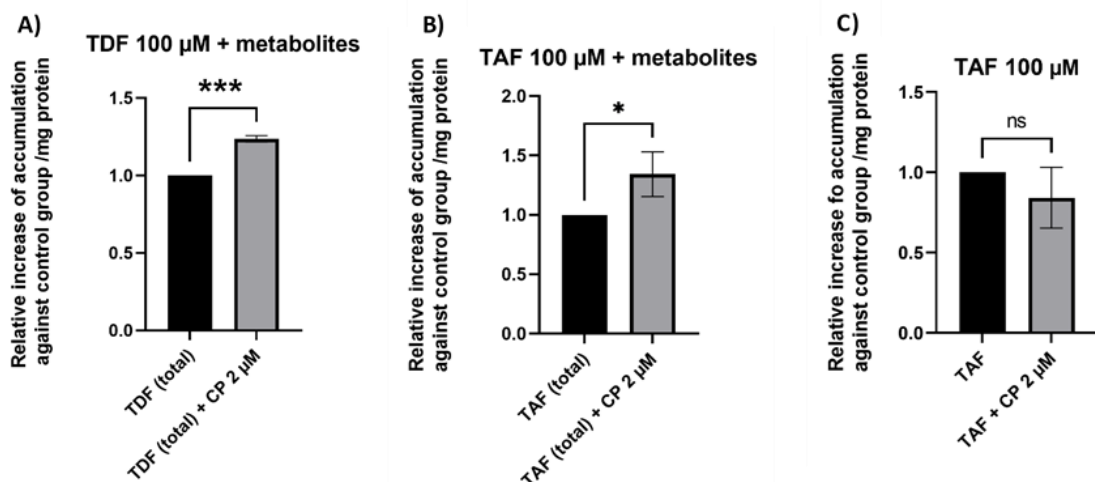
Ačkoliv je TAF je považován za stabilní proléčivo (Birkus et al. 2015), i u něj jsme pozorovali významnou hydrolyzu v rPCIS. Koncentrace TFV v rPCIS více jak 6× převyšovala koncentraci TAF (Obrázek 15C). V přítomnosti CP100356 dochází ke zvýšené kumulaci metabolitů TDF (Obrázek 15B) a TAF (Obrázek 15D) v čase.



**Obrázek 15:** Grafické znázornění akumulace TDF (A, B) a TAF (C, D), testovaných při koncentraci 100 μM, a jejich metabolitů v buňkách rPCIS bez inhibitoru ABCB1 (A, C), v přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1 (CP100356, 2 μM) (B, D) (V případě grafu (A) n = 4, pro graf (B) n = 2, pro graf (C) n = 3 a pro graf (D) n = 2). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD.

V následujícím kroku jsme kvantifikovali vliv CP100356 (2 μM) na akumulaci metabolitů u TDF a metabolitů a parentní látky u TAF. V případě TDF došlo k 1,2-násobnému zvýšení akumulace v 60. minutě (Obrázek 16A), v případě TAF a jeho metabolitů se akumulace v 60. minutě zvýšila přibližně 1,3krát (Obrázek 16B). Když

jsme hodnotili vliv CP100356 na akumulaci pouze TAF, statisticky signifikantní rozdíl nebyl pozorován (Obrázek 16C).



**Obrázek 16:** Grafické znázornění relativního nárůstu akumulace u metabolitů TDF (A) ( $n = 4$ ), u TAF v součtu s jeho metabolity (B) ( $n = 4$ ) a u TAF bez metabolitů (C) ( $n = 3$ ) v rPCIS po inkubaci (60 min) TDF (100  $\mu$ M) nebo TAF (100  $\mu$ M) s/bez CP100356, modelového inhibitoru ABCB1. Pro zhodnocení statistické významnosti výsledků byl použit nepárový Studentův t-test.

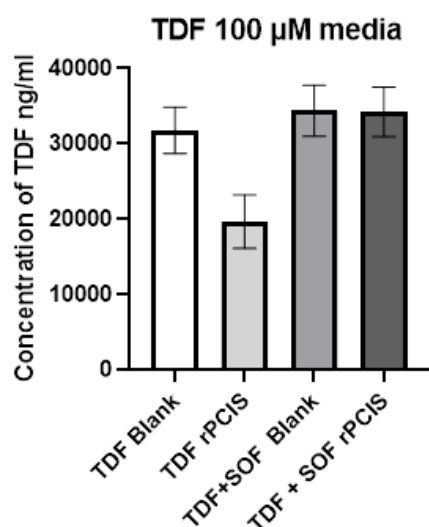
### 6.2.3. Efekt sofosbuviru na stabilitu a akumulaci TDF a jeho metabolitů v rPCIS

Sofosbuvir (SOF) patří mezi DAA (přímo působící antivirotika neboli Direct acting antivirals) používaná v terapii hepatitidy C. Jedná se o proléčivo, které je v organismu metabolizováno na 2'-deoxy-2'-alfa-flouro-beta-C-methyluridine-5'-monofosfát, který je následně fosforylován na trifosfát, který působí jako inhibitor NS5B (non-structural protein 5B) polymerázy a zabraňuje tak replikaci (DrugBank 2015, National Center for Biotechnology Information 2021). SOF je popsáným substrátem ABCB1 a ABCG2 (FDA 2013).

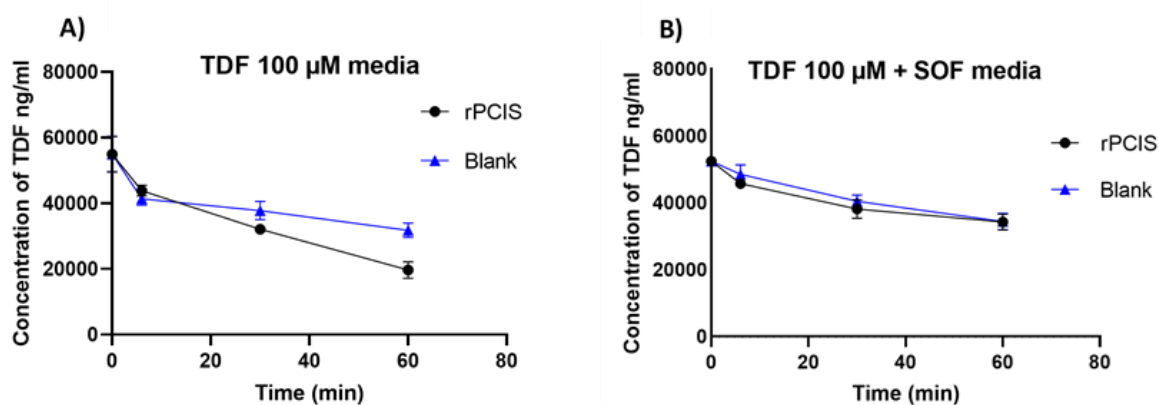
Klinické studie ukázaly, že současné užívání TDF spolu se SOF vede ke zvýšení biodostupnosti TFV (FDA 2013). V případě společného užívání TDF a SOF je proto doporučeno monitorovat u pacientů nežádoucí účinky TDF a případně zvážit výměnu TDF za TAF (AIDSinfo 2016). Nicméně molekulární mechanismus této lékové interakce není znám.

Na základě výše zmíněných informací o farmakokinetické lékové interakci TDF a SOF jsme se rozhodli testovat vliv SOF (100  $\mu$ M) na stabilitu TDF (100  $\mu$ M) vůči hydrolázám a na akumulaci TDF (100  $\mu$ M) (a jeho metabolitů) v rPCIS.

Dosud provedené experimenty naznačují, že SOF (100  $\mu$ M) neovlivňuje hydrolýzu TDF (100  $\mu$ M) v médiu, ale zlepšuje jeho stabilitu v přítomnosti rPCIS (Obrázek 17).

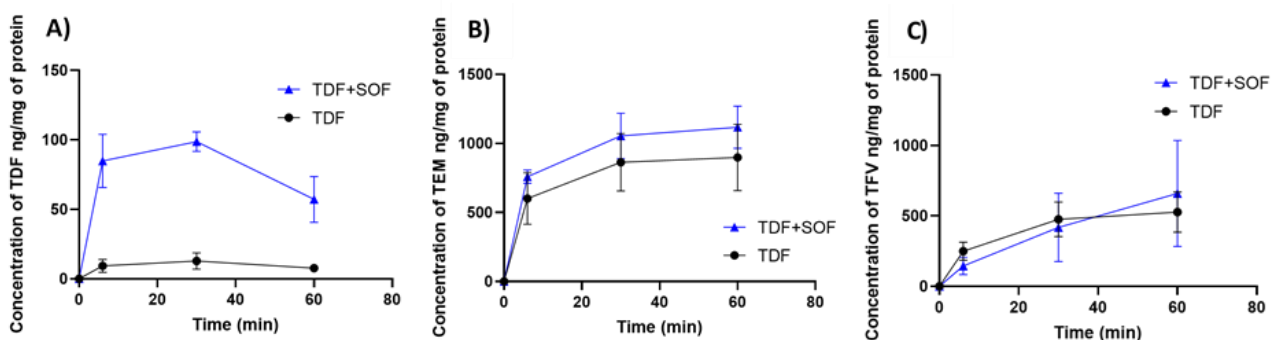


**Obrázek 17:** Grafické znázornění vlivu SOF (100  $\mu$ M) na stabilitu TDF (100  $\mu$ M) v přítomnosti rPCIS. V grafu jsou znázorněny koncentrace TDF v médiu (ng/ml) po 60 minutách inkubace (n = 2). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD.



**Obrázek 18:** Grafické znázornění rychlosti rozkladu TDF (100  $\mu$ M) v médiu v přítomnosti rPCIS bez SOF (A) a se SOF (100  $\mu$ M) (B) (pro oba grafy n = 2). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD.

Z dat, která jsme získali, vyplývá, že v případě, kdy do inkubačního roztoku nebyl přidán SOF (Obrázek 18A), je TDF výrazně rychleji rozkládán v přítomnosti rPCIS než v čistém médiu, zatímco v případě, kdy byl použit inkubační roztok se SOF (Obrázek 18B), je rychlost rozkladu TDF v přítomnosti rPCIS a v čistém médiu téměř totožná, což naznačuje, že by SOF mohl inhibovat degradaci TDF hydrolázami přítomnými ve střevě. Tato tvrzení by ale bylo dále potřeba potvrdit provedením vyššího počtu na sobě nezávislých měření.



**Obrázek 19:** Grafické znázornění vlivu SOF (100  $\mu$ M) na akumulaci TDF testovaného při koncentraci 100  $\mu$ M (A) a jeho metabolitů TEM (B), TFV (C) v buňkách rPCIS (pro všechny grafy  $n = 2$ ). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD.

V dalším kroku jsme pozorovali, že SOF (100  $\mu$ M) zvyšoval akumulaci TDF a TEM v rPCIS ve všech měřených časech (Obrázek 19). Vzhledem k nízkému počtu biologických replikátů je však nutné tento experiment zopakovat, aby bylo možné provést statistickou analýzu a vyvodit závěry.

Nicméně lze alespoň spekulovat, že mechanismus zvýšené biodostupnosti TFV v kombinaci TDF a SOF může částečně vzniknout na podkladě vyšší absorpce TDF a TEM z GIT, která může být způsobena jednak inhibicí ABCB1, jednak sníženým hydrolytickým štěpením TDF v přítomnosti SOF. Možnost lékové interakce SOF a TDF na ABCB1 je však nutné ještě ověřit pomocí oboustranného transportu přes monovrstvu Caco-2 buněk. A vzhledem k možným mezidruhovým rozdílům (např. v zastoupení a funkci hydroláz) je nutné provést akumulační experiment i na lidském střevu.



## 7. Diskuze

TDF a TAF jsou proléčiva antivirotika TFV ze skupiny NRTI, která zvyšují biodostupnost TFV po p.o. podání (Birkus et al. 2015). TDF i TAF jsou v monoterapii léčbou první volby u pacientů s chronickou HBV infekcí a patří mezi preferenční léčiva v rámci cART u HIV infekce (Tang et al. 2020, WHO 2018).

Z důvodu časté nutnosti polyterapie je u HIV pacientů vyšší riziko vzniku lékových interakcí. Jedním z důležitých míst vzniku lékových interakcí jsou lékové efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2. Tyto transportéry ovlivňují farmakokinetiku léčiv (Alam et al. 2016) a ve střevě jsou zodpovědné za snížení absorpce některých léčiv (DeGorter et al. 2012). TDF i TAF jsou substráty obou těchto efluxních transportérů (Begley et al. 2018, EMA et al. 2015, Neumanova et al. 2014). TDF i TAF patří dle biofarmaceutického klasifikačního systému do třídy 3 (EMA 2015, FDA 2011), tedy mezi léčiva s vysokou rozpustností a nízkou permeabilitou, jejichž vstup přes membrány mohou zásadně ovlivnit efluxní transportéry (Solvo Biotechnology n.d.). Lze tedy předpokládat, že ABCB1 a ABCG2 snižují střevní absorpci těchto léčiv a lékové interakce na těchto transportérech mohou být příčinou změn v biodostupnosti TDF a TAF.

V prvním kroku jsme se pomocí transportních studií provedených na monovrstvách tvořených Caco-2 buňkami snažili potvrdit, že TDF a TAF jsou substráty ABCB1 a ABCG2. Bez přítomnosti inhibitoru byly hodnoty ER u TDF i TAF  $>2$ , což poukazuje na zapojení aktivního transportu. V přítomnosti Ly335979 (1  $\mu\text{M}$ ) došlo v případě TDF i TAF k poklesu ER o více jak 50 %. Tím jsme prokázali zapojení ABCB1 do transepiteliálního přestupu těchto látek (Giacomini et al. 2010). V případě interakce testovaných látek s ABCG2 byla situace komplikovanější. Ko143 (1  $\mu\text{M}$ ) nesnížil ER u TDF a o méně než 50 % v případě TAF. Tyto výsledky ukazují, že TDF by nebyl transportován ABCG2, zatímco TAF by byl pouze slabým substrátem. Důvodem, proč vliv inhibice ABCG2 na transport TDF a TAF nebyl pozorován, může být náš zvolený transportní model. Používali jsme Caco-2 buňky v pasážích 5 – 25, dle výsledků studie provedené Xia et al. (2005) je exprese ABCG2 transportéru výrazně nižší než u buněk získaných z pasáží pozdějších (Xia et al. 2005). Lze se tedy i domnívat, že množství ABCG2 bylo i nižší v porovnání MDCKII\_ABCG2 buňkami použitými v předchozích studiích, které TDF jako substrát ABCG2 potvrdily (Neumanova et al. 2014).

U TDF a TAF jsme rovněž porovnali jejich permeabilitu přes buněčnou monovrstvu Caco-2 buněk ve směru AB (pomocí hodnot  $P_{app}$  AB), a to pro parentní látky i parentní látky s metabolity (produkty hydrolýzy představovaly 5 % z analyzovaného obsahu). Naše výsledky ukazují, že permeabilita přes buněčnou monovrstvu Caco-2 buněk ve směru AB je mírně vyšší u TAF, nicméně tento rozdíl není zřejmě dostatečný, aby vysvětlil rozdílnou biodostupnost u obou látek. Tyto výsledky naznačují, že rozdíl v biodostupnosti TAF a TDF je způsoben pravděpodobně rozdílným metabolismem ve střevě a/nebo játrech. Hodnoty  $P_{app}$  AB, které jsme naměřili u TDF (10  $\mu$ M), odpovídají hodnotám získaným Tong et al. (2007). Informace o vzájemném porovnání permeability TDF a TAF však doposud nebyly publikovány.

Na buněčné linii Caco-2 byly rovněž testovány i TFV a TEM vznikající hydrolýzou TDF. Výsledky, které jsme získali, však byly značně variabilní. Experiment se tedy pravděpodobně technicky nezdařil a je zapotřebí ho zopakovat. Zajímavé by rovněž bylo u TFV a TEM stanovit koeficienty permeability  $P_{app}$  AB a porovnat je s permeabilitou TDF a TAF.

Vliv selektivní inhibice ABCB1 na transport TDF a TAF ve střevě se nám podařilo potvrdit i pomocí rPCIS připravených z potkaního jejunu, u něhož byl již řadou studií potvrzen vliv ABCB1 na transport látek spadajících do třídy 3 biofarmaceutického klasifikačního systému (Dahan a Amidon 2009). Z dat, která jsme ze studií na rPCIS získali, lze vyvodit, že CP100356 (2  $\mu$ M) zvyšuje akumulaci TDF a jeho metabolitů (TEM a TFV) v buňkách rPCIS, přičemž metabolity tvořily majoritní část. Tento výsledek souvisí s velmi rychlou hydrolýzou TDF v médiu, která je ještě urychlena přítomností rPCIS, a pak hydrolýzou ve vlastním řezu. Rychlá hydrolýza TDF, kterou jsme pozorovali, odpovídá obecně uznávanému tvrzení, že TDF je velmi rychle hydrolyzován střevními hydrolázami (Birkus et al. 2015, Callebaut et al. 2015, Lee et al. 2005, Moss et al. 2017). CP100356 (2  $\mu$ M) rovněž zvyšoval akumulaci TFV v rPCIS inkubovaných v přítomnosti TAF, zatímco koncentrace TAF se oproti kontrolnímu vzorku nezvýšila. I zde jsme sledovali stabilitu TAF v inkubačním médiu. Nepozorovali jsem žádnou významnou hydrolytickou aktivitu, a to ani v přítomnosti rPCIS. Proto usuzujeme, že nárůst TFV v rPCIS s CP100356 je dán zvýšeným zachytem TAF a jeho rychlou hydrolýzou na TFV. Na akumulaci samotného TAF nemělo použití CP100356 signifikantní vliv. TAF se jevil tedy jako stabilnější forma. Nicméně naše výsledky v rozporu s publikovanou literaturou, která zastává názor, že TAF je na TFV

přeměňován především až v cílových buňkách (Birkus et al. 2015, Lee et al. 2005, Markowitz et al. 2014, Ruane et al. 2013), naznačují, že i TAF je ve střevě do značné míry hydrolyzován (koncentrace TFV v rPCIS více než 6× převyšovala koncentraci TAF). Pro posouzení významnosti našich výsledků by však bylo vhodné provést dále studie zaměřené na farmakokinetiku TDF a TAF i na lidském střevě, jelikož výsledky, které jsme získali pomocí rPCIS, mohou být zatíženy mezidruhovými rozdíly v expresi střevních hydroláz (Taketani et al. 2007).

Dále jsme se v rámci této práce pokusili objasnit klinicky pozorovanou lékovou interakci mezi TDF a SOF. SOF je pro léčivo používané v terapii hepatitidy C, které (po přeměně na aktivní metabolit) působí jako inhibitor NS5B polymerázy (DrugBank 2015). Aktuální doporučené postupy pro léčbu HIV infekce uvádějí, že společné podávání TDF a SOF může vést k výraznému zvýšení biodostupnosti TFV (AIDSinfo 2016, FDA 2013). Z toho důvodu je doporučováno při společném podávání TDF a SOF monitorovat potenciální nežádoucí účinky TDF a u pacientů, u nichž je riziko rozvoje nežádoucích účinků TDF vysoké, zvážit výměnu TDF za TAF (AIDSinfo 2016). Podstata lékové interakce TDF a SOF však doposud nebyla plně objasněna.

Data, která jsme získali pomocí studie na rPCIS naznačují, že SOF (100  $\mu$ M) neovlivňuje rozklad TDF (100  $\mu$ M) v čistém médiu, ale zvyšuje jeho stabilitu v přítomnosti rPCIS. Léková interakce SOF s TDF by tedy teoreticky mohla spočívat v ovlivnění střevní hydrolytické aktivity. Významnou roli v metabolismu SOF hraje mimo jiné i karboxylesteráza (DrugBank 2015), která je zodpovědná i za rychlou hydrolýzu TDF ve střevě (Moss et al. 2017). SOF a TDF jsou tedy ve střevě metabolizovány stejným enzymem. Je tedy možné, že SOF inhibuje střevní karboxylesterázu, čímž se sníží rychlost hydrolýzy TDF ve střevě. Rovněž je potřeba vzít v úvahu, že SOF i TDF jsou substráty efluxních transportérů ABCB1 a ABCG2 (FDA 2013, Neumanova et al. 2014). Na lékové interakci TDF a SOF by se tedy potenciálně mohla podílet i kompetitivní inhibice efluxních transportérů ABCB1 a ABCG2. To naznačují i naše data. Přítomnost SOF (100  $\mu$ M) zvyšuje akumulaci TDF a jeho metabolitu TEM v rPCIS. Vzhledem k nízkému počtu provedených měření ( $n=2$ ) je však potřeba naše výsledky potvrdit dalšími experimenty na rPCIS a dále i na lidském střevě. Lékovou interakci TDF a SOF na úrovni efluxních transportérů by dále bylo vhodné ověřit pomocí transportní studie na Caco-2 buněčné linii. Při interpretaci výsledků studie lékové interakce SOF a TDF je rovněž potřeba vzít v potaz, že námi používané koncentrace (u TDF i SOF jsme pracovali

se 100 $\mu$ M roztoky) neodráží skutečné koncentrace, kterých tato léčiva ve střevě při podávání obvyklých terapeutických dávek dosahují. Jelikož však už námi testované koncentrace jsou za podmínek experimentu z hlediska rozpustnosti hraniční, nejsme schopni pomocí *ex vivo* metod interakci TDF se SOF v koncentracích, kterých dosahují ve střevě při obvyklém dávkování, otestovat.

## 8. Závěr

Tato práce se věnuje studiu interakcí proléčiv antivirotika TFV, TDF a TAF, se střevními efluxními ABC transportéry, konkrétně ABCB1 a ABCG2, a to pomocí *in vitro* a *ex vivo* modelů střevní bariéry. V experimentální části se nám pomocí studií na buněčné linii Caco-2 a rPCIS podařilo potvrdit, že TDF i TAF jsou substráty efluxního transportéru ABCB1 a že jeho inhibice je spojena se zvýšenou akumulací metabolitů TDF a TAF v rPCIS a může tak vést ke zvýšení biodostupnosti TFV po p.o. podání TDF a TAF.

Obecně uznávané tvrzení, že TDF a TAF jsou substráty efluxního transportéru ABCG2 (Begley et al. 2018, EMA 2015, Neumanova et al. 2014), naše studie na buněčné linii Caco-2 nepotvrdily, což může souviset s nízkou expresí ABCG2 transportéru Caco-2 buňkami (Xia et al. 2005) nebo s rozdílností použitého experimentálního modelu.

Výsledky získané ze studií, které jsme provedli na rPCIS, dále nepotvrdily předpoklad, že TAF není hydrolyzován střevními enzymy, nicméně jeho stabilita je větší ve srovnání s TDF. Naše výsledky jsou v rozporu s řadou studií, ze kterých vyplývá, že TAF je specificky metabolizován až v cílových buňkách, což vede, v porovnání s TDF, k výraznému snížení systémových koncentrací TFV po p.o. podání TAF (Lee et al. 2005, Markowitz et al. 2014, Ruane et al. 2013). Námi získané výsledky by ale bylo vhodné dále potvrdit dalším opakováním na potkaním střevě a studii na lidském střevě, jelikož výsledky získané z rPCIS mohou být zatíženy mezidruhovými rozdíly v expresi střevních hydroláz (Taketani et al. 2007).

Za použití rPCIS jsme se rovněž pokusili objasnit podstatu klinicky pozorované lékové interakce TDF se SOF. Doporučené postupy pro léčbu HIV infekce uvádějí, že společné užívání TDF a SOF může vést ke zvýšení biodostupnosti TFV (AIDSinfo 2016). Data, která jsme ze studií provedených na rPCIS získali, naznačují, že jedním z možných mechanismů této interakce by mohla být inhibice hydrolyzy TDF ve střevě SOF. Při použití SOF jsme pozorovali zvýšení stability TDF v přítomnosti rPCIS. Naše výsledky dále naznačují, že na interakci TDF a SOF by se mohla podílet i inhibice efluxních transportérů. SOF zvyšoval akumulaci TDF a jeho metabolitu TEM v buňkách rPCIS ve všech hodnocených časech. Vzhledem k nízkému počtu provedených měření je ale potřeba naše zjištění potvrdit dalšími studii na rPCIS a poté i na lidském střevě.

## 9. Literární zdroje

Ahlman, H., & Nilsson, O. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology*, *12*. [https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl\\_2.s63](https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_2.s63)

Achira, M., Suzuki, J., Ito, K., & Sugiyama, Y. (1999). Comparative studies to determine the selective inhibitors for P-glycoprotein and cytochrome P4503A4. *AAPS PharmSci*, *1*(4), 14-19.

AIDSinfo. (2016). Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents living with HIV. Retrieved January 13, 2021, from <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/initiation-antiretroviral-therapy>

Alam, C., Whyte-Allman, S. K., Omeragic, A., & Bendayan, R. (2016). Role and modulation of drug transporters in HIV-1 therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *103*, 121-143. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.001>

Amin, M. L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug target insights*, *7*, 27–34. <https://doi.org/10.4137/DTI.S12519>

Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Mørck Nielsen, H., & Sarmiento, B. (2013). Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Current Drug Metabolism*, *14*(1), 4–20. <https://doi.org/10.2174/1389200211309010004>

Austin Doyle, L., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>

Bachmakov, I., Rekersbrink, S., Hofmann, U., Eichelbaum, M., & Fromm, M. F. (2005). Characterisation of (R/S)-propafenone and its metabolites as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *371*(3), 195–201. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1025-y>

Balzarini, J., Holy, A., Jindrich, J., Naesens, L., Snoeck, R., Schols, D., & De Clercq, E. (1993). Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: Potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)- 2,6-diaminopurine.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 332–338.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.37.2.332>

Barditch-Crovo, P., Deeks, S. G., Collier, A., Safrin, S., Coakley, D. F., Miller, M., Kearney, B. P., Coleman, R. L., Lamy, P. D., Kahn, J. O., McGowan, I., & Lietman, P. S. (2001). Phase i/ii trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(10), 2733–2739.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2733-2739.2001>

Bartels, A. L. (2012). Blood-brain barrier p-glycoprotein function in neurodegenerative disease. *Current Pharmaceutical Design*, 17(26), 2771–2777.  
<https://doi.org/10.2174/138161211797440122>

Begley, R., Das, M., Zhong, L., Ling, J., Kearney, B. P., & Custodio, J. M. (2018). Pharmacokinetics of tenofovir alafenamide when coadministered with other HIV antiretrovirals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 78(4), 465–472.  
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001699>

Birkus, G., Bam, R. A., Willkom, M., Frey, C. R., Tsai, L., Stray, K. M., Yant, S. R., & Cihlar, T. (2015). Intracellular activation of tenofovir alafenamide and the effect of viral and host protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(1), 316–322.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01834-15>

Breedveld, P., Zelcer, N., Pluim, D., Sönmezer, O., Tibben, M. M., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., van Tellingen, O., Borst, P., & Schellens, J. H. (2004). Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer research*, 64(16), 5804–5811. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-4062>

Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Wielinga, P., van Tellingen, O., Schinkel, A. H., & Schellens, J. H. (2005). The effect of BCRP1 (ABCG2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer research*, 65(7), 2577–2582.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472>

- Brendel, K., Jay Gandolfi, A., Krumdieck, C. L., & Smith, P. F. (1987). Tissue slicing and culturing revisited. *Trends in Pharmacological Sciences*, 8(1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(87\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90023-X)
- Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (2018). *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Callebaut, C., Stepan, G., Tian, Y., & Miller, M. D. (2015). In vitro virology profile of tenofovir alafenamide, a novel oral prodrug of tenofovir with improved antiviral activity compared to that of tenofovir disoproxil fumarate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 5909–5916. <https://doi.org/10.1128/AAC.01152-15>
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., & Verne, G. N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(6), 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>
- Cascorbi I. (2011). P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handbook of experimental pharmacology*, (201), 261–283. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_6)
- Cavet, M. E., West, M., & Simmons, N. L. (1996). Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *British journal of pharmacology*, 118(6), 1389–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15550.x>
- Cervený, L., Ptáková, Z., Durisová, M., & Staud, F. (2018). Interactions of protease inhibitors atazanavir and ritonavir with ABCB1, ABCG2, and ABCC2 transporters: Effect on transplacental disposition in rats. *Reproductive toxicology*, 79, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.05.008>
- Cihlar, T., Ho, E. S., Lin, D. C., & Mulato, A. S. (2001). Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 20(4-7), 641–648. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002341>
- Cihlar, T., Birkus, G., Greenwalt, D. E., & Hitchcock, M. J. (2002). Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse



transcriptase inhibitors. *Antiviral research*, 54(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(01\)00210-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(01)00210-8)

Cleophas, M. C., Joosten, L. A., Stamp, L. K., Dalbeth, N., Woodward, O. M., & Merriman, T. R. (2017). ABCG2 polymorphisms in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 10, 129–142. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S105854>

Dahan, A., & Amidon, G. L. (2009). Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. *Molecular pharmaceutics*, 6(1), 19–28. <https://doi.org/10.1021/mp800088f>

Dai, C. L., Tiwari, A. K., Wu, C. P., Su, X. D., Wang, S. R., Liu, D. G., Ashby, C. R., Jr, Huang, Y., Robey, R. W., Liang, Y. J., Chen, L. M., Shi, C. J., Ambudkar, S. V., Chen, Z. S., & Fu, L. W. (2008). Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. *Cancer research*, 68(19), 7905–7914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0499>

de Graaf, I. A., Groothuis, G. M., & Olinga, P. (2007). Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 3(6), 879–898. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.6.879>

de Graaf, I. A., Olinga, P., de Jager, M. H., Merema, M. T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E. G., & Groothuis, G. M. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature protocols*, 5(9), 1540–1551. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.111>

de Kanter, R., Tuin, A., van de Kerkhof, E., Martignoni, M., Draaisma, A. L., de Jager, M. H., de Graaf, I. A., Meijer, D. K., & Groothuis, G. M. (2005). A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 51(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.07.007>

DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J., & Kim, R. B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529>

- Delaney, W. E., 4th, Ray, A. S., Yang, H., Qi, X., Xiong, S., Zhu, Y., & Miller, M. D. (2006). Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2471–2477. <https://doi.org/10.1128/AAC.00138-06>
- Dietrich, C. G., Geier, A., & Oude Elferink, R. P. (2003). ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, 52(12), 1788–1795. <https://doi.org/10.1136/gut.52.12.1788>
- Dostálek, M., Janošítková, E., Juříčka, J., & Zahradníková, L. (2006). *Farmakokinetika*. M. Dostálek (Ed.). Praha, Česká republika: Grada Publishing.
- Doyle, L., & Ross, D. D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 22(47), 7340–7358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206938>
- DrugBank. (2015). Sofosbuvir. Retrieved April 4, 2021, from <https://go.drugbank.com/drugs/DB08934>
- Drugs. (2020). Drug Interactions Checker. Retrieved November 14, 2020, from [https://www.drugs.com/drug\\_interactions.html](https://www.drugs.com/drug_interactions.html)
- EMA. (2015). Assessment report. Genvoya. Retrieved April 28, 2021, from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/genvoya-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/genvoya-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- FDA. (2011). Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review. NDA: 022577. Retrieved April 28, 2021, from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/022577Orig1s000ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/022577Orig1s000ClinPharmR.pdf)
- FDA. (2013). Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review. NDA: 205834. Retrieved April 22, 2021, from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/205834Orig1s000ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/205834Orig1s000ClinPharmR.pdf)
- Fung, H. B., Stone, E. A., & Piacenti, F. J. (2002). Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical therapeutics*, 24(10), 1515–1548. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(02\)80058-3](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(02)80058-3)

Gallant, J. E., & Deresinski, S. (2003). Tenofovir disoproxil fumarate. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37(7), 944–950. <https://doi.org/10.1086/378068>

Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., ... Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>

Gilead Sciences. (2019). Vemlidy (tenofovir alafenamide) [product monograph]. Retrieved April 23, 2021, from <https://www.gilead.com/science-and-medicine/medicines>

Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry*, 62, 385–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002125>

Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., & Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annual review of genetics*, 29, 607–649. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.003135>

Groothuis, G. M., & de Graaf, I. A. (2013). Precision-cut intestinal slices as in vitro tool for studies on drug metabolism. *Current drug metabolism*, 14(1), 112–119. <https://doi.org/10.2174/138920013804545197>

Gupta, A., Zhang, Y., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2004). HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(1), 334–341. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065342>

Gupta, A., Dai, Y., Vethanayagam, R. R., Hebert, M. F., Thummel, K. E., Unadkat, J. D., Ross, D. D., & Mao, Q. (2006). Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 58(3), 374–383. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0173-6>

Gupta, A., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2007). Interactions of azole antifungal agents with the human breast cancer resistance protein (BCRP). *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(12), 3226–3235. <https://doi.org/10.1002/jps.20963>

- Gupta, S. K., Post, F. A., Arribas, J. R., Eron, J. J., Wohl, D. A., Clarke, A. E., ... Das, M. (2019). Renal safety of tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate: A pooled analysis of 26 clinical trials. *AIDS*, *33*(9), 1455–1465. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002223>
- Gutmann, H., Fricker, G., Drewe, J., Toeroek, M., & Miller, D. S. (1999). Interactions of HIV protease inhibitors with ATP-dependent drug export proteins. *Molecular pharmacology*, *56*(2), 383–389. <https://doi.org/10.1124/mol.56.2.383>
- Hendrikx, J. J. M. A., Lagas, J. S., Rosing, H., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2013). P-glycoprotein and cytochrome P450 3A act together in restricting the oral bioavailability of paclitaxel. *International Journal of Cancer*, *132*(10), 2439–2447. <https://doi.org/10.1002/ijc.27912>
- Houghton, P. J., Germain, G. S., Harwood, F. C., Schuetz, J. D., Stewart, C. F., Buchdunger, E., & Traxler, P. (2004). Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer research*, *64*(7), 2333–2337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3344>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G., & 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>
- Hunter, J., & Hirst, B.H. (1997). Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* *25*, 129–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00497-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00497-3)
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., & Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, *346*(6282), 362–365. <https://doi.org/10.1038/346362a0>
- Chan, H. L., Fung, S., Seto, W. K., Chuang, W. L., Chen, C. Y., Kim, H. J., Hui, A. J., Janssen, H. L., Chowdhury, A., Tsang, T. Y., Mehta, R., Gane, E., Flaherty, J. F., Massetto, B., Gaggar, A., Kitrinou, K. M., Lin, L., Subramanian, G. M., McHutchison, J. G., Lim, Y. S., ... GS-US-320-0110 Investigators (2016). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *The lancet*.

*Gastroenterology & hepatology*, 1(3), 185–195. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30024-3)

Chan, L. M., Lowes, S., & Hirst, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 25–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.07.003>

Chapman, T., McGavin, J., & Noble, S. (2003). Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs*, 63(15), 1597–1608. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363150-00006>

Chauffert, B., Martin, M., Hammann, A., Michel, M. F., & Martin, F. (1986). Amiodarone-induced enhancement of doxorubicin and 4'-deoxydoxorubicin cytotoxicity to rat colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer research*, 46(2), 825–830.

Chaves, C., Remiao, F., Cisternino, S., & Decleves, X. (2017). Opioids and the blood-brain barrier: a dynamic interaction with consequences on drug disposition in brain. *Current neuropharmacology*, 15(8), 1156–1173. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170504095823>

Chen, C., Mireles, R. J., Campbell, S. D., Lin, J., Mills, J. B., Xu, J. J., & Smolarek, T. A. (2005). Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 33(4), 537–546. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002477>

Chen, Z. S., Robey, R. W., Belinsky, M. G., Shchhaveleva, I., Ren, X. Q., Sugimoto, Y., Ross, D. D., Bates, S. E., & Kruh, G. D. (2003). Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer research*, 63(14), 4048–4054.

Ichikawa-Haraguchi, M., Sumizawa, T., Yoshimura, A., Furukawa, T., Hiramoto, S., Sugita, M., & Akiyama, S. (1993). Progesterone and its metabolites: the potent inhibitors of the transporting activity of P-glycoprotein in the adrenal gland. *Biochimica et biophysica acta*, 1158(3), 201–208. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90016-2)

Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., & Sugimoto, Y. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Molecular pharmacology*, 64(3), 610–618. <https://doi.org/10.1124/mol.64.3.610>

- Imaz, A., & Podzamczar, D. (2017). Tenofovir alafenamide, emtricitabine, elvitegravir, and cobicistat combination therapy for the treatment of HIV. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(3), 195–209. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1286736>
- Jones, P. M., & George, A. M. (1998). A new structural model for P-glycoprotein. *The Journal of membrane biology*, 166(2), 133–147. <https://doi.org/10.1007/s002329900455>
- Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R. P., Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.202607599>
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*, 455(1), 152–162. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
- Kaminsky, L. S., & Zhang, Q. Y. (2003). The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 31(12), 1520–1525. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.12.1520>
- Kappelhoff, B. S., Huitema, A. D., Crommentuyn, K. M., Mulder, J. W., Meenhorst, P. L., van Gorp, E. C., Mairuhu, A. T., & Beijnen, J. H. (2005). Development and validation of a population pharmacokinetic model for ritonavir used as a booster or as an antiviral agent in HIV-1-infected patients. *British journal of clinical pharmacology*, 59(2), 174–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02241.x>
- Kearney, B. P., Flaherty, J. F., & Shah, J. (2004). Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical pharmacokinetics*, 43(9), 595–612. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443090-00003>
- Kichloo, A., Chugh, S. S., Gupta, S., Panday, J., & Goldar, G. E. (2019). Tenofovir and severe symptomatic hypophosphatemia. *Journal of investigative medicine high impact case reports*, 7, 2324709619848796. <https://doi.org/10.1177/2324709619848796>
- Kim, W. Y., & Benet, L. Z. (2004). P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharmaceutical research*, 21(7), 1284–1293. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000033017.52484.81>

Kitamura, S., Maeda, K., Wang, Y., & Sugiyama, Y. (2008). Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36(10), 2014–2023. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021410>

König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R. J. (2016). Human intestinal barrier function in health and disease. *Clinical and translational gastroenterology*, 7(10). <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>

Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E., & Ho, K. J. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Analytical biochemistry*, 104(1), 118–123. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90284-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90284-5)

Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L. A., Papatheodoridis, G., ... Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 67(2), 370–398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>

Lee, W. A., He, G. X., Eisenberg, E., Cihlar, T., Swaminathan, S., Mulato, A., & Cundy, K. C. (2005). Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1898–1906. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1898-1906.2005>

Lemos, C., Jansen, G., & Peters, G. J. (2008). Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *British journal of cancer*, 98(5), 857–862. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604213>

Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>

Li, M., de Graaf, I. A., & Groothuis, G. 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>

- Li, Y., Yan, L., Shi, Y., Bai, Y., Tang, J., & Wang, L. (2015). CYP3A5 and ABCB1 genotype influence tacrolimus and sirolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *SpringerPlus*, 4, 637. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1425-5>
- Lowes, S., & Simmons, N. L. (2002). Multiple pathways for fluoroquinolone secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *British journal of pharmacology*, 135(5), 1263–1275. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704560>
- Lown, K. S., Mayo, R. R., Leichtman, A. B., Hsiao, H. L., Turgeon, D. K., Schmiedlin-Ren, P., Brown, M. B., Guo, W., Rossi, S. J., Benet, L. Z., & Watkins, P. B. (1997). Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(3), 248–260. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(97\)90027-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(97)90027-8)
- Luo, Z., Liu, Y., Zhao, B., Tang, M., Dong, H., Zhang, L., Lv, B., & Wei, L. (2013). Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 68(2), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.06.001>
- Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., Tohgo, A., Hausheer, F. H., van Waardenburg, R. C., de Jong, L. A., Pluim, D., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2001). Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(4), 935–941.
- Mao Q. (2008). BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharmaceutical research*, 25(6), 1244–1255. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9537-z>
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *The AAPS journal*, 17(1), 65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
- Markowitz, M., Zolopa, A., Squires, K., Ruane, P., Coakley, D., Kearney, B., Zhong, L., Wulfsohn, M., Miller, M. D., & Lee, W. A. (2014). Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and antiretroviral activity of tenofovir alafenamide, a new prodrug of the HIV reverse transcriptase inhibitor tenofovir, in HIV-infected adults. *The*



*Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(5), 1362–1369.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt532>

Martínková, J., Grim, J., Hojdíková, H., Chládek, J., Chládková, J., Kulda, K., Libiger, J. (2018). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů* (2nd ed.). J. Martínková (ED.). Praha, Česká republika: Grada Publishing.

Matsuo, H., Takada, T., Nakayama, A., Shimizu, T., Sakiyama, M., Shimizu, S., Chiba, T., Nakashima, H., Nakamura, T., Takada, Y., Sakurai, Y., Hosoya, T., Shinomiya, N., & Ichida, K. (2014). ABCG2 dysfunction increases the risk of renal overload hyperuricemia. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 33(4-6), 266–274.  
<https://doi.org/10.1080/15257770.2013.866679>

McDevitt, C. A., Collins, R. F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I. D., Ford, R. C., & Callaghan, R. (2006). Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure*, 14(11), 1623–1632.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2006.08.014>

Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A. E., & Schinkel, A. H. (2005). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Molecular pharmacology*, 67(5), 1758–1764. <https://doi.org/10.1124/mol.104.010439>

Merino, G., Alvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H., & Prieto, J. G. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34(4), 690–695.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.105.008219>

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>

Morlat, P., Vivot, A., Vandenhende, M. A., Dauchy, F. A., Asselineau, J., Déti, E., Gerard, Y., Lazaro, E., Duffau, P., Neau, D., Bonnet, F., Chêne, G., & Groupe D'épidémiologie Clinique du Sida en Aquitaine (Gecsa) (2013). Role of traditional risk factors and antiretroviral drugs in the incidence of chronic kidney disease, ANRS CO3

Aquitaine cohort, France, 2004-2012. *PloS one*, 8(6), e66223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066223>

Moss, D. M., Domanico, P., Watkins, M., Park, S., Randolph, R., Wring, S., Rajoli, R., Hobson, J., Rannard, S., Siccardi, M., & Owen, A. (2017). Simulating intestinal transporter and enzyme activity in a physiologically based pharmacokinetic model for tenofovir disoproxil fumarate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(7), e00105-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00105-17>

Munić, V., Kelnerić, Z., Mikac, L., & Eraković Haber, V. (2010). Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.016>

Murínová, I. (2019). Klinicky významné lékové interakce antiretrovirotik. *Časopis lékařů českých*, 158, 289-294.

Nakayama, A., Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Ikebuchi, Y., Ito, K., Hosoya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., & Shinomiya, N. (2011). ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 30(12), 1091–1097. <https://doi.org/10.1080/15257770.2011.633953>

Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R., & Ross, D. D. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1084–1103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.002>

National Center for Biotechnology Information. (2021). PubChem Compound Summary for CID 45375808, Sofosbuvir. Retrieved April 2, 2021, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/psi-7977>

Neumanova, Z., Cervený, L., Ceckova, M., & Staud, F. (2014). Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS (London, England)*, 28(1), 9–17. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000112>

Nguyen, T. V., Smith, D. E., & Fleisher, D. (2007). PEPT1 enhances the uptake of gabapentin via trans-stimulation of b<sub>0</sub>,+ exchange. *Pharmaceutical research*, 24(2), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9155-6>

Özvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Várady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J. D., Váradi, A., Kéri, G., Orfi, L., Németh, K., & Sarkadi, B. (2004). High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Molecular pharmacology*, 65(6), 1485–1495. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1485>

Pan, G., Giri, N., & Elmquist, W. F. (2007). Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(7), 1165–1173. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.014274>

Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J. W., & Schinkel, A. H. (2005). Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 312(1), 144–152. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.073916>

Possidente, M., Dragoni, S., Franco, G., Gori, M., Bertelli, E., Teodori, E., Frosini, M., & Valoti, M. (2011). Rat intestinal precision-cut slices as an in vitro model to study xenobiotic interaction with transporters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 79(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.04.004>

Ray, A. S., Cihlar, T., Robinson, K. L., Tong, L., Vela, J. E., Fuller, M. D., Wieman, L. M., Eisenberg, E. J., & Rhodes, G. R. (2006). Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(10), 3297–3304. <https://doi.org/10.1128/AAC.00251-06>

Ray, A. S., Fordyce, M. W., & Hitchcock, M. J. (2016). Tenofovir alafenamide: A novel prodrug of tenofovir for the treatment of human immunodeficiency virus. *Antiviral research*, 125, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.11.009>

Ruane, P. J., DeJesus, E., Berger, D., Markowitz, M., Bredeek, U. F., Callebaut, C., Zhong, L., Ramanathan, S., Rhee, M. S., Fordyce, M. W., & Yale, K. (2013). Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of tenofovir alafenamide as

10-day monotherapy in HIV-1-positive adults. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 63(4), 449–455. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182965d45>

Salvo-Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista espanola de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 107(11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>

Sankatsing, S. U., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., Lange, J. M., & Prins, J. M. (2004). P glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1073–1081. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1073-1081.2004>

Santbergen, M., van der Zande, M., Gerssen, A., Bouwmeester, H., & Nielen, M. (2020). Dynamic in vitro intestinal barrier model coupled to chip-based liquid chromatography mass spectrometry for oral bioavailability studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(5), 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02336-6>

Sharom F. J. (2014). Complex interplay between the p-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. *Frontiers in oncology*, 4, 41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00041>

Shi, S., & Li, Y. (2014). Interplay of drug-metabolizing enzymes and transporters in drug absorption and disposition. *Current drug metabolism*, 15(10), 915–941. <https://doi.org/10.2174/1389200216666150401110610>

Shi, Z., Peng, X. X., Kim, I. W., Shukla, S., Si, Q. S., Robey, R. W., Bates, S. E., Shen, T., Ashby, C. R., Jr, Fu, L. W., Ambudkar, S. V., & Chen, Z. S. (2007). Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer research*, 67(22), 11012–11020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2686>

Schweinlin, M., Rossi, A., Lodes, N., Lotz, C., Hackenberg, S., Steinke, M., Walles, H., & Groeber, F. (2017). Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery. *Drug delivery and translational research*, 7(2), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0316-9>

Skálová, L., Boušková, I., Machala, M., Matoušková, P., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Svobodová, H., Szotáková, B., Trejtnar, F., Vondráček, J., Wsól, V. (2017). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha, Česká republika: Karolinum.

Solvo Biotechnology (n.d.). Biopharmaceutical drug DISPOSITION classification systém-knowledge center-Solvo Biotechnology. Retrieved April 28, 2021, from <https://www.solvobiotech.com/knowledge-center/bddcs>

Stray, K. M., Bam, R. A., Birkus, G., Hao, J., Lepist, E. I., Yant, S. R., Ray, A. S., & Cihlar, T. (2013). Evaluation of the effect of cobicistat on the in vitro renal transport and cytotoxicity potential of tenofovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), 4982–4989.

Suo, Z., & Johnson, K. A. (1998). Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by an antiviral inhibitor, (R)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)adenine. *The Journal of biological chemistry*, 273(42), 27250–27258. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27250>

Švihovec, J., Bultas, J., Anzebacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., & Votava, M. (Eds.). (2018). *Farmakologie*. Praha, Česká republika: Grada Publishing.

Takano, M., Hasegawa, R., Fukuda, T., Yumoto, R., Nagai, J., & Murakami, T. (1998). Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 358(3), 289–294. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00607-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00607-4)

Taketani, M., Shii, M., Ohura, K., Ninomiya, S., & Imai, T. (2007). Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life sciences*, 81(11), 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.026>

Tang, A.S., Thornton, K., & HBV Primary Care Workgroup. (2020). Hepatitis B management: Guidance for the primary care provider. Retrieved December 20, 2020, from <https://www.hepatitisb.uw.edu/page/primary-care-workgroup/guidance>

Thwala, L. N., Santander-Ortega, M. J., Lozano, M. V., & Csaba, N. S. (2018). Functionalized polymeric nanostructures for mucosal drug delivery. In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials: Concepts, Development and Clinical Translation* (pp. 449–487). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50878-0.00015-X>

- Tong, L., Phan, T. K., Robinson, K. L., Babusis, D., Strab, R., Bhoopathy, S., Hidalgo, I. J., Rhodes, G. R., & 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>
- Tseng, A., Hughes, C. A., Wu, J., Seet, J., & Phillips, E. J. (2017). Cobicistat versus ritonavir: similar pharmacokinetic enhancers but some important differences. *The Annals of pharmacotherapy*, *51*(11), 1008–1022. <https://doi.org/10.1177/1060028017717018>
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., & Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer research*, *41*(5), 1967–1972.
- Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S., & Sakurai, Y. (1983). Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer research*, *43*(6), 2905–2910.
- Twentyman, P. R., Fox, N. E., & White, D. J. (1987). Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *British journal of cancer*, *56*(1), 55–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.153>
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T., & Hori, R. (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *The Journal of biological chemistry*, *267*(34), 24248–24252.
- van Breemen, R. B., & Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *1*(2), 175–185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- van Herwaarden, A. E., & Schinkel, A. H. (2006). The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends in pharmacological sciences*, *27*(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.007>

Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, *11*(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>

Volpe D. A. (2008). Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of pharmaceutical sciences*, *97*(2), 712–725. <https://doi.org/10.1002/jps.21010>

Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., & Baba, M. (2003). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Molecular pharmacology*, *63*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.65>

Weiss, J., Rose, J., Storch, C. H., Ketabi-Kiyanvash, N., Sauer, A., Haefeli, W. E., & Efferth, T. (2007). Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *59*(2), 238–245. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl474>

WHO. (2018). Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV. *WHO Guidelines*, (December), 1–82. Retrieved December 20, 2020, from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/277395>

WHO. (2020). Global Health Observatory (GHO). Retrieved December 20, 2020, from <https://www.who.int/data/gho>

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: the biological fate of chemicals*, *33*(5), 637–643. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003442>

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., Pei, K., Walker, D., Lue, L. F., Stanimirovic, D., & Zhang, W. (2009). ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(17), 5463–5475. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5103-08.2009>

Yuan, H., Li, N., & Lai, Y. (2009). Evaluation of in vitro models for screening alkaline phosphatase-mediated bioconversion of phosphate ester prodrugs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37(7), 1443–1447. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.026245>

Zack J, Doyle E, Graham H et al. (2015, October). *Bioequivalence of a fixed-dose combination of rilpivirine/emtricitabine/tenofovir alafenamide to elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir alafenamide and rilpivirine*. European AIDS Conference, Barcelona, Spain.

Zhang, Y., Gupta, A., Wang, H., Zhou, L., Vethanayagam, R. R., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2005). BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical research*, 22(12), 2023–2034. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-8384-4>