

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studium interakce antiretrovirotika maraviroku s
lékovými transportéry ABCB1 a ABCG2**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Kateřina Erbenová

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

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za její odborné vedení a cenné připomínky, dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Ťupové za její trpělivost a podnětné rady při vypracování této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

Studentka: Kateřina Erbenová

Školitelka: PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium interakce antiretrovirotika maraviroku s lékovými transportéry ABCB1 a ABCG2.

Maravirok je inhibitor vstupu CCR5 HIV viru do buněk představující jednu z důležitých komponent antiretrovirální terapie. Pro optimalizaci léčebné strategie a minimalizaci rizik kombinované antiretrovirální léčby s využitím maraviroku je důležitá znalost interakce tohoto léčiva s ostatními antiretrovirotiky. Konkrétně interakce na membránových transportérech by mohly ovlivnit farmakokinetiku, a tím koncentrace podaných léčiv ve tkáních a navodit buď nedostatečnou účinnost terapie, nebo zvýšení její toxicity.

Náplní této práce bylo experimentálně vyhodnotit interakci maraviroku s dvěma nejvýznamnějšími aktivními lékovými transportéry z rodiny ABC transportních proteinů, ABCB1 (P-glykoproteinem) a ABCG2 (BCRP). S pomocí *in vitro* metod na buněčných liniích byly řešeny dva základní cíle: (1) schopnost maraviroku inhibovat eflux modelového substrátu pomocí ABCB1 a ABCG2 a (2) schopnost těchto transportérů přenášet maravirok jako svůj substrát.

Z dat získaných v rámci této práce je patrné, že maravirok neinhibuje eflux fluorescenčního substrátu Hoechst 33342 z ABCB1- ani ABCG2- exprimujících buněk *in vitro* a s největší pravděpodobností tak není inhibitorem ani jednoho z těchto transportérů. Transportní studie na monovrstvách ABCB1- a ABCG2- exprimujících MDCKII buněk prokázaly, že maravirok není substrátem ABCG2. Překvapivě toto antiretrovirotikum není transportováno ani lidským ABCB1, naše studie ale prokázala, že je substrátem endogenního psího Abcb1 v MDCKII

buňkách, což poukazuje na mezidruhové rozdíly v substrátové afinitě tohoto transportéru k maraviroku.

S ohledem na optimalizaci bezpečnosti a účinnosti kombinované antiretrovirální terapie u HIV pacientů a studium vzájemných lékových interakcí jednotlivých antiretrovirotik lze konstatovat, že riziko farmakokinetických lékových interakcí na úrovni ABCB1 a ABCG2 transportérů je pro kombinaci s maravirokem minimální.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Kateřina Erbenová

Supervisor: PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of interactions antiretroviral drug maraviroc with drug transporters ABCB1 and ABCG2.

Maraviroc is inhibitor of CCR5 HIV virus entry into the cells representing one of the important components of antiretroviral therapy. To optimize the treatment strategies and minimize the therapeutic risks of maraviroc-containing combination antiretroviral therapy, it is important to know the interactions of this drug with other antiretrovirals. In particular, interaction on membrane transporters may affect pharmacokinetics and thereby the tissue concentrations of administered drugs, leading to insufficient efficacy of the therapy or increased toxicity.

The aim of this study was to experimentally evaluate interaction of maraviroc with the two most important active drug transporters of the ABC transporter superfamily, ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2 (BCRP). Using *in vitro* methods employing cell lines we aimed to fulfil two main goals: (1) to evaluate the inhibitory effect of maraviroc on ABCB1 and ABCG2 transporters and (2) to study if any of these transporters could transfer maraviroc as their substrate.

The data obtained in this study clearly indicate that maraviroc does not inhibit efflux of Hoechst 33342 from the ABCB1- and ABCG2- expressing cells *in vitro* and therefore cannot be considered as inhibitor of any of these two ABC transporters. Transport studies employing monolayers of ABCB1- and ABCG2-

expressing MDCKII cells revealed that maraviroc is not substrate of human ABCG2. Interestingly, the antiretroviral drug is not transported by human ABCB1, but it is the substrate of endogenous canine Abcb1 in MDCKII cells, indicating interspecies differences in the substrate affinity of the transporter to maraviroc.

When considering the optimization of safety and efficacy during combined antiretroviral therapy in HIV patients and the study on drug-drug interactions among antiretrovirals, we can conclude that there is only negligible risk of pharmacokinetic ABCB1- or ABCG2-mediated drug-drug interactions of maraviroc with other antiretrovirals.

OBSAH

1.	<i>SEZNAM ZKRATEK</i>	1
2.	<i>ÚVOD</i>	3
3.	<i>TEORETICKÁ ČÁST</i>	5
3.1.	VIRUS LIDSKÉ IMUNODEFICIENCE (HIV, Human Immunodeficiency Virus) 5	
3.1.1.	Epidemiologie a patogeneze	5
3.1.2.	Klinická stádia	6
3.2.	ANTIRETROVIRÁLNÍ LÉČBA	7
3.2.1.	Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy	9
3.2.2.	Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy.....	9
3.2.3.	Inhibitory proteáz.....	9
3.2.4.	Inhibitory integrázy	9
3.2.5.	Inhibitory vstupu HIV do buňky	10
3.2.6.	Inhibitory fúze membrán	10
3.3.	ATP - BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTÉRY	10
3.3.1.	P-glykoprotein (ABCB1, MDR1, P-gp).....	11
3.3.2.	Breast cancer resistance protein (ABCG2, BCRP).....	14
3.4.	FARMAKOKINETICKÉ LÉKOVÉ INTERAKCE	16
3.5.	MARAVIROK	17
3.5.1.	Chemické vlastnosti.....	17
3.5.2.	Mechanismus účinku	18
3.5.3.	Farmakokinetika	18
3.5.4.	Lékové interakce maraviroku.....	18
4.	<i>CÍL PRÁCE</i>	20
5.	<i>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</i>	21
5.1.	MATERIÁL	21
5.1.1.	Buněčné linie a jejich kultivace	21
5.1.2.	Chemikálie a činidla.....	21
5.2.	INHIBIČNÍ STUDIE MARAVIROKU, AKUMULACE HOECHST 33342.....	22
5.2.1.	Princip	22
5.2.2.	Postup	24
5.3.	OBOUSMĚRNÝ TRANSPORT MARAVIROKU PŘES MONOVRSTVU MDCKII BUNĚČNÝCH LINÍ.....	25
5.3.1.	Princip	25
5.3.2.	Metodika.....	27

5.4.	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	28
6.	<i>VÝSLEDKY</i>	29
6.1.	INHIBIČNÍ STUDIE	29
6.1.1.	MDCKII – parentní linie	29
6.1.2.	MDCKII – ABCB1	30
6.1.3.	MDCKII – ABCG2.....	31
6.2.	TRANSPORTNÍ STUDIE MARAVIROKU.....	32
6.2.1.	MDCKII – ABCB1	32
6.2.2.	MDCKII – parentní linie	33
6.2.3.	MDCKII – ABCG2.....	34
6.2.4.	Souhrn výsledků transportní studie maraviroku.....	35
7.	<i>DISKUZE</i>	36
8.	<i>ZÁVĚR</i>	38
9.	<i>POUŽITÁ LITERATURA</i>	39

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC transportér	ATP-binding cassette transportér
ABCB1/MDR1	P-glykoprotein
Abcb1	endogenní psí P-glykoprotein (v MDCKII)
ABCG2/BCRP	Breast cancer resistance protein
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ART	antiretrovirální terapie
cART	kombinovaná antiretrovirální terapie
CYP3A4	člen rodiny jaterních enzymů cytochromu P450
CYT P450	cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency (evropská léková agentura)
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration (americká regulační léková agentura)
GF 120918	elacridar (inhibitor ABCB1 a ABCG2 transportérů)
HIV	virus lidské imunodeficiencie (Human immunodeficiency virus)
HOE	Hoechst 33342, bisbenzimid (fluorescenční substrát ABCB1 a ABCG2)
ITC	mezinárodní transportové konsorcium
LI	lékové interakce
Ly 335979	zosuquidar (inhibitor ABCB1)

MDCKII	buněčná linie odvozená od psích tubulárních buněk ledvin (Madine Darby Canine Kidney)
MDR	mnohočetná léková rezistence (Multidrug Resistance)
MVC	maravirok
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
TMD	transmembránová doména

2. ÚVOD

V současné době žije na světě téměř 40 miliónů lidí s infekcí viru lidské imunodeficiency (HIV, Human Immunodeficiency Virus), z nichž asi 17 miliónů je léčeno pomocí antiretrovirální terapie (ART) (UNAIDS 2016). ART snižuje morbiditu a mortalitu HIV pacientů a vede k prodloužení a celkovému zvýšení kvality života a oddálení rozvoje oportunních nemocí a syndromu získané imunodeficiency (AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome).

Pro dosažení dostatečné virové suprese se využívá kombinovaná antiretrovirální terapie (cART) zahrnující tři až čtyři současně podávaná léčiva, obvykle z různých skupin antiretrovirálních léčiv. Zavedení cART do terapie HIV vedlo oproti monoterapii k dalšímu zvýšení účinnosti léčby a prodloužení života pacientů a též ke sníženému výskytu rozvoje rezistentních forem HIV.

Kombinovaná léčba však s sebou nese vysoké riziko rozvoje lékových interakcí, které mohou vést ke zvýšenému výskytu i rozsahu nežádoucích účinků a toxicity některého z léčiv, vzniku rezistence, ale při vhodném využití i ke zlepšení farmakokinetiky či farmakodynamiky interagujících léčiv (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017).

Důležitým místem pro rozvoj klinicky relevantních farmakokinetických lékových interakcí (LI), které vedou ke změně koncentraci podávaných léčiv ve tkáních a celém organismu, jsou tzv. ATP-binding cassette (ABC) lékové transportéry. Dosud nejlépe popsanými ABC lékovými transportéry jsou P - glykoprotein (P-gp, ABCB1) a tzv. „breast cancer resistance protein“ (BCRP, ABCG2), jež jsou přítomné ve střevě, v játrech, ledvinách a na biologických bariérách organismu (hematoencefalické bariéry, hematotestikulární bariéry, placentě), kde se svou efluxní aktivitou podílejí na aktivní translokaci endogenních a exogenních látek přes buněčné membrány a ovlivnění jejich absorpce, distribuce a eliminace. Mnoho antiretrovirálních léčiv je potvrzenými substráty, inhibitory a/nebo induktory ABCB1 a/nebo ABCG2, což může v rámci kombinované ART vést k farmakokinetickým lékovým interakcím současně podaných léčiv a změnou jejich tkáňových koncentrací k ovlivnění účinnosti i bezpečnosti terapie (Alam et al. 2016).

Pro vstup HIV viru do cílové buňky je nutná interakce obalových glykoproteinů (gp120) na povrchu viru s CD4 receptorem a chemokinovým

koreceptorem na lidské buňce. Mezi hlavní koreceptory podílející se na vstupu HIV do buňky patří CCR5 a CXCR4 (Vandekerckhove et al. 2008).

Maravirok je moderní antiretrovirální léčivo, které blokuje vstup HIV viru do buněk inhibicí CCR5 a používá se jako součást cART. Předchozí studie naznačují, že biologická dostupnost maraviroku v organismu může být ovlivněna ABC transportéry, a proto cílem této práce je rozšířit dosavadní poznatky ohledně interakcí maraviroku se dvěma důležitými zástupci ABC transportérů, ABCB1 a ABCG2.

První část této diplomové práce je zaměřená na studium inhibičního potenciálu maraviroku vůči ABCB1 a ABCG2 *in vitro*, pomocí akumulční studie s Hoechst 33342, modelovým substrátem obou transportérů. Ve druhé části diplomové práce byla využita metoda obousměrného transportu maraviroku přes buněčnou monovrstvu s cílem zjistit, zda je maravirok též substrátem těchto transportérů *in vitro*. V obou případech byly využity buněčné linie MDCKII stabilně exprimující lidské ABCB1 (MDCKII-ABCB1) a ABCG2 (MDCKII-ABCG2) transportéry a porovnány akumulace, resp. transport v těchto liniích oproti parentní linii MDCKII.

Cílem tak bylo získat data ohledně schopnosti maraviroku interagovat s ABCB1 a ABCG2 a rozšířit tak znalosti ohledně podstaty farmakokinetického chování v organismu a rizika vzniku farmakokinetických LI zprostředkovaných transportéry.

3. TEORETICKÁ ČÁST

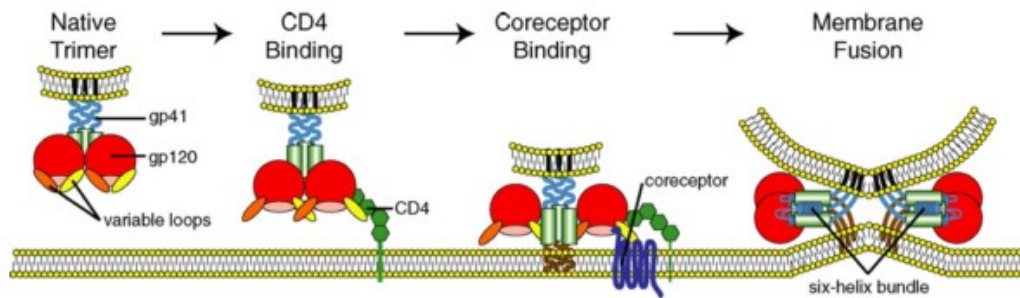
3.1. VIRUS LIDSKÉ IMUNODEFICIENCE (HIV, Human Immunodeficiency Virus)

3.1.1. Epidemiologie a patogeneze

HIV je RNA virus, který se řadí do skupiny retrovirů, přičemž rozlišujeme HIV - 1 a HIV - 2 virus. Nicméně převážná většina infekcí je způsobena virem HIV - 1, HIV - 2 je rozšířen pouze v některých oblastech západní Afriky a obecně se považuje za méně závažnou, pomaleji progredující variantu HIV nákazy s nižší mortalitou. Mezi lidmi může být HIV přenášen prostřednictvím krve a jejích derivátů, dalšími tělními sekrety (např. sperma, vaginální sekrety) a také transplacentárně z matky na plod (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017).

Pro vstup HIV-1 do cílové buňky je nutná interakce obalových glykoproteinů (gp120) na povrchu viru s receptorem CD4 a chemokinovým koreceptorem na lidské buňce (Obr. 1). Dva hlavní koreceptory podílející se na vstupu do buňky jsou CCR5 a CXCR4 (Vandekerckhove et al. 2008) a určují takzvaný „tropismus“ viru. Jejich přítomnost či nepřítomnost u jedinců může mít vliv na šíření HIV. Genetická nepřítomnost povrchové exprese CCR5 vyjádřena u $\Delta 32$ homozygotního genotypu populace vede k téměř úplné odolnosti proti infekci HIV-1. Snížená exprese povrchového CCR5 u CCR5 $\Delta 32$ heterozygotů je spojena s nižší rychlostí progresse onemocnění (Invitrogen et al. 2014).

Po vniknutí HIV do buněk nesoucích receptor CD4, zejména v CD4⁺ T – lymfocytech dochází k masivní replikaci viru. Neléčená HIV infekce je progresivní, dochází k postupné destrukci imunitního systému a v důsledku toho ke zvýšenému nebezpečí infekce dalšími patogeny (Salavec et al. 2011).



Obrázek 1: Vstup HIV viru do hostitelské buňky. Vstup HIV je zahájen připojením gp120 na CD4, následuje interakce gp120 s koreceptorem, což umožní vložení fúzního peptidu do hostitelské membrány, vytvoří se fúzní pór, který zajišťuje vstup kapsidy viru do hostitelské buňky (převzato z: Tilton & Doms 2010).

3.1.2. Klinická stádia

Nakažení virem HIV má tři stádia – akutní primární infekce, chronická latentní infekce a klinické onemocnění AIDS.

Akutní primární infekce. Tato fáze je ohraničena od momentu infekce až do indukce detekovatelných protilátek. Příznaky se projevují několik dní po nakažení a přetrvávají dny až týdny. Mezi hlavní symptomy patří bolest hlavy, únava, bolest kloubů, anorexie, nauzea, zvracení, průjem, aj.

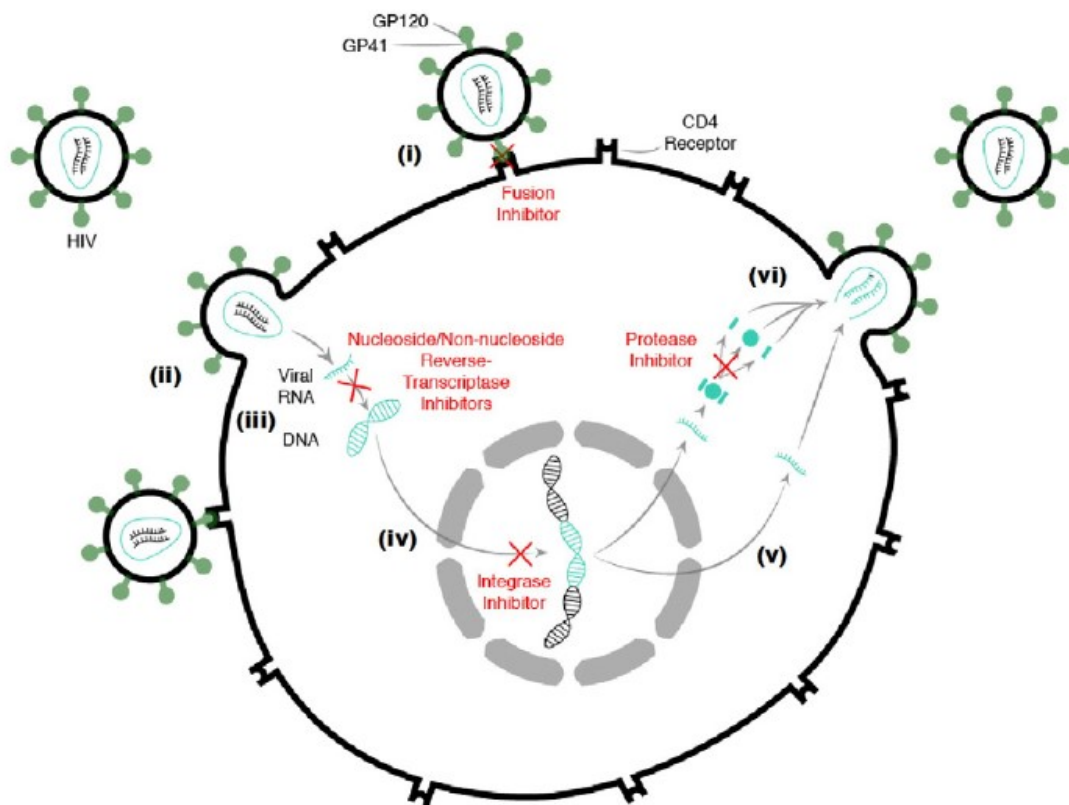
Chronická latentní fáze má individuální průběh v řádu jednotek až desítek let. Postupně je narušována rovnováha mezi replikací viru a imunitním systémem, což se projevuje poklesem CD4⁺ lymfocytů a pozvolným vzestupem virové replikace (Salavec et al. 2011).

Onemocnění AIDS propuká ve chvíli, kdy dojde k nekontrolovatelnému množení viru a vyčerpání imunitního systému. Lidé s AIDS jsou pak oproti zdravým jedincům více náchylní k tzv. oportunním infekcím (např. tuberkulóza, Kaposiho sarkom, kandidóza jícnu, aj.). AIDS je diagnostikováno u lidí s HIV se sníženým počtem CD4 buněk pod 200/mm³, s jednou či více oportunních nemocí, nebo obojím. Bez léčby přežívají lidé s AIDS přibližně 3 roky, antiretrovirální léčba však umožnila významné prodloužení a zlepšení kvality života u HIV pozitivních pacientů a oddálení nástupu AIDS (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017).

3.2. ANTIRETROVIRÁLNÍ LÉČBA

V současné době je ART doporučována všem osobám žijícím s HIV. Oproti dřívějším doporučením, zohledňujícím počet CD4 buněk a virových partikulí v krvi HIV pozitivního pacienta, je nyní doporučováno ART zahájit co nejdříve po odhalení nákazy (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017). Některé situace jako je těhotenství, AIDS, časná HIV infekce a komorbidity spojené s HIV zvyšují naléhavost zahájení léčby.

Terapie HIV se od nástupu cART v roce 1996 neustále zlepšuje. Díky cART došlo k výraznému snížení morbidity i mortality souvisejících s HIV a proměňuje toto onemocnění do zvládnutelného chronického stavu. Léčba HIV je tedy v dnešní době zpravidla vždy kombinovaná, kdy počáteční režim zahrnuje tři léčiva z alespoň dvou lékových skupin. Důležitý je výběr cART podle individuálních potřeb konkrétního pacienta zohledňující potenciální vedlejší účinky, komorbidity, možné lékové interakce atd. ART je celoživotní léčbou, a proto je její nedílnou součástí pacientova adherence. Vzhledem ke složitým režimům této léčby bývá non-adherence častým jevem a může zvýšit riziko lékové rezistence a selhání léčby. Během léčby se může vyskytnout celá řada nežádoucích účinků, které mohou non-adherenci umocnit (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017). Od roku 2014 jsou na trhu mnohé kombinované léky, které poskytují snadnější dávkování a zlepšují bezpečnostní profil léčby (Badowski et al. 2016). Současná terapie HIV-1 zahrnuje šest hlavních farmakologických tříd, z nichž každá cílí na jinou fázi životního cyklu viru (Obr. 2) (Alam et al. 2016).



Obrázek 2: Životní cyklus viru a možné zásahy antiretrovirotik. Virový vstup začíná vazbou gp120 na receptor CD4 a CCR5/CXCR4 koreceptory (i). Tato interakce způsobuje fúzi virové a hostitelské buněčné membrány, která umožňuje vložení virové RNA do cytoplazmy cílové buňky (ii). HIV-1 RNA okamžitě pomocí reverzní transkriptázy transkribována do dvouřetězcové DNA (iii), následuje její integrace do genomu hostitelské buňky pomocí proteinové integrázy (iv). Následná transkripce a translace virových genů v infikované buňce vede k produkci prekurzorových proteinů nezbytných pro montáž nových virionů (v). Konečný krok v replikačním cyklu HIV zahrnuje virovou maturaci a sekreci, který se vyznačuje štěpením prekurzorových virových proteinů HIV proteázou, čímž se získá zralý a infekční virus (vi) (převzato z: Alam et al. 2016).

3.2.1. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

Tato léčiva jsou hostitelskou buňkou fosforylována až na trifosfát, dochází k inkorporaci falešného nukleosidu do DNA a inhibici HIV transkriptázy. Do této skupiny patří zidovudin, lamivudin, abacavir, tenofovir, didanosin, stavudin, telbivudin, emtricitabin (Rang et al. 2012). Jedná se o nejstarší skupinu, která je vysoce účinná a stále patří mezi nejvíce doporučovaná léčiva cART první i další linie (World Health Organization 2016; Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017)

3.2.2. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

Do této skupiny patří chemicky různorodá léčiva, která se vážou přímo na reverzní transkriptázu blízko katalytického místa a inaktivují ji. Většinou jsou to inhibitory, induktory nebo substráty jaterního cytochromu P450. Řadí se sem efavirenz, nevirapin, etravirin a rilpivirin (Rang et al. 2012; Azijn et al. 2010). Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy první generace efavirenz a nevirapin jsou běžnou složkou cART první linie. Obě tyto látky prokázaly dlouhodobou účinnost, nicméně jejich užívání může být omezeno častým rozvojem rezistence. Tato skutečnost vedla k vývoji nové generace nenukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy, do které řadíme etravirin a rilpivirin (Azijn et al. 2010).

3.2.3. Inhibitory proteáz

Jedná se o atypické peptidy, které jako falešné substráty inhibují retrovirové proteázy. Mezi tato léčiva patří ritonavir, indinavir, saquinavir, nelfinavir, lopinavir, a další (Rang et al. 2012). Používají se nejčastěji v kombinaci s inhibitory reverzní transkriptázy. Jelikož prokazují vysokou odolnost vůči vzniku rezistence, mohou být vysoce užitečné u pacientů s non-adherencí (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017).

3.2.4. Inhibitory integrázy

Tyto látky inhibují inkorporaci genomu HIV-1 do genomu hostitelské buňky. Skupina zahrnuje raltegravir a elvitegravir (Alam et al. 2016). Tato léčiva se mohou podávat do kombinace s nukleosidovými inhibitory reverzní transkriptázy

v rámci první linie, ale také v kombinacích v rámci dalších linií (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017).

3.2.5. Inhibitory vstupu HIV do buňky

Jedná se o poměrně novou skupinu léčiv, která má v terapii HIV slibný potenciál, především u pacientů rezistentních vůči inhibitorům reverzní transkriptázy nebo inhibitorům proteáz (Tilton & Doms 2010). Většina léčiv má odlišnou molekulární strukturu a specifický mechanismus účinku (Briz et al. 2006). Jediným schváleným léčivem z této skupiny je maravirok, který antagonizuje CCR5 koreceptor a brání tak vstupu CCR5 – tropního HIV do hostitelských buněk (Lieberman-Blum et al. 2008). Další slibná léčiva jsou prozatím součástí klinického hodnocení, ve třetí fázi je fostemsavir a monoklonální protilátka ibalizumab, v druhé fázi cenicriviroc a monoklonální protilátka pro-140 (Badowski et al. 2016).

3.2.6. Inhibitory fúze membrán

Jedná se také o novou slibnou skupinu léčiv, jejímž účinkem dochází k blokádě fúze mezi virovou partikulí a hostitelskou buňkou. Zatím jediným zástupcem této skupiny je peptidické léčivo enfuvirtid (Greenberg & Cammack 2004).

3.3. ATP - BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTÉRY

Rodina ABC transportérů představuje nejrozsáhlejší skupinu transmembránových proteinů, zajišťujících aktivní přenos xenobiotik a endogenních látek přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu. Energie potřebná pro transport je získávána vazbou a následnou hydrolyzou ATP. Lidský genom obsahuje 48 genů kódujících ABC transportéry, které jsou rozděleny do sedmi skupin značených písmeny A až G.

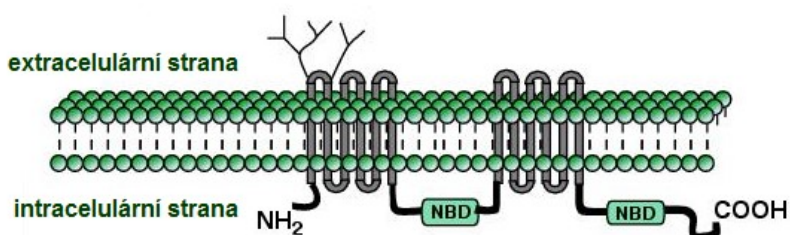
Všechny funkčně aktivní ABC transportéry jsou složeny ze dvou a více ATP vázajících jednotek, známých jako NBFs (nukleotide-binding folds), a dvou transmembránových jednotek (TMDs). TMDs obsahují 6-11 šroubovic protínajících membránu a jejich struktura určuje specifitu substrátů daných transportérů. ATP vázající jednotky se nacházejí v cytoplasmě a zajišťují štěpení

ATP na energii nutnou pro následný transport substrátu přes membránu. Transport substrátu obvykle probíhá jen jedním směrem (Dean et al. 2001).

Obsah této práce je zaměřen na podskupinu ABC transportérů tzv. lékové efluxní ABC transportéry, které zajišťují transport léčiv ven z buněk za spotřeby ATP, konkrétně na nejvýznamnější lékové efluxní ABC transportéry P - glykoprotein a BCRP transportér (Schinkel & Jonker 2003).

3.3.1. P-glykoprotein (ABCB1, MDR1, P-gp)

ABCB1 protein byl prvním a zároveň je nejlépe popsáným lékovým efluxním ABC transportérem, který byl poprvé objeven jako povrchový antigen v buňkách vaječníků morčete (Juliano & Ling 1976) a charakterizován jako protein zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci (Ling V. 1987). Jedná se o transmembránový protein o velikosti 170 kD, který je složen ze dvou transmembránových domén, z nichž každá obsahuje šest α -šroubovic a dvě intracelulární ATP - vázající části. První extracelulární klička je N-glykosylována (Schinkel & Jonker 2003) viz Obr. 3.

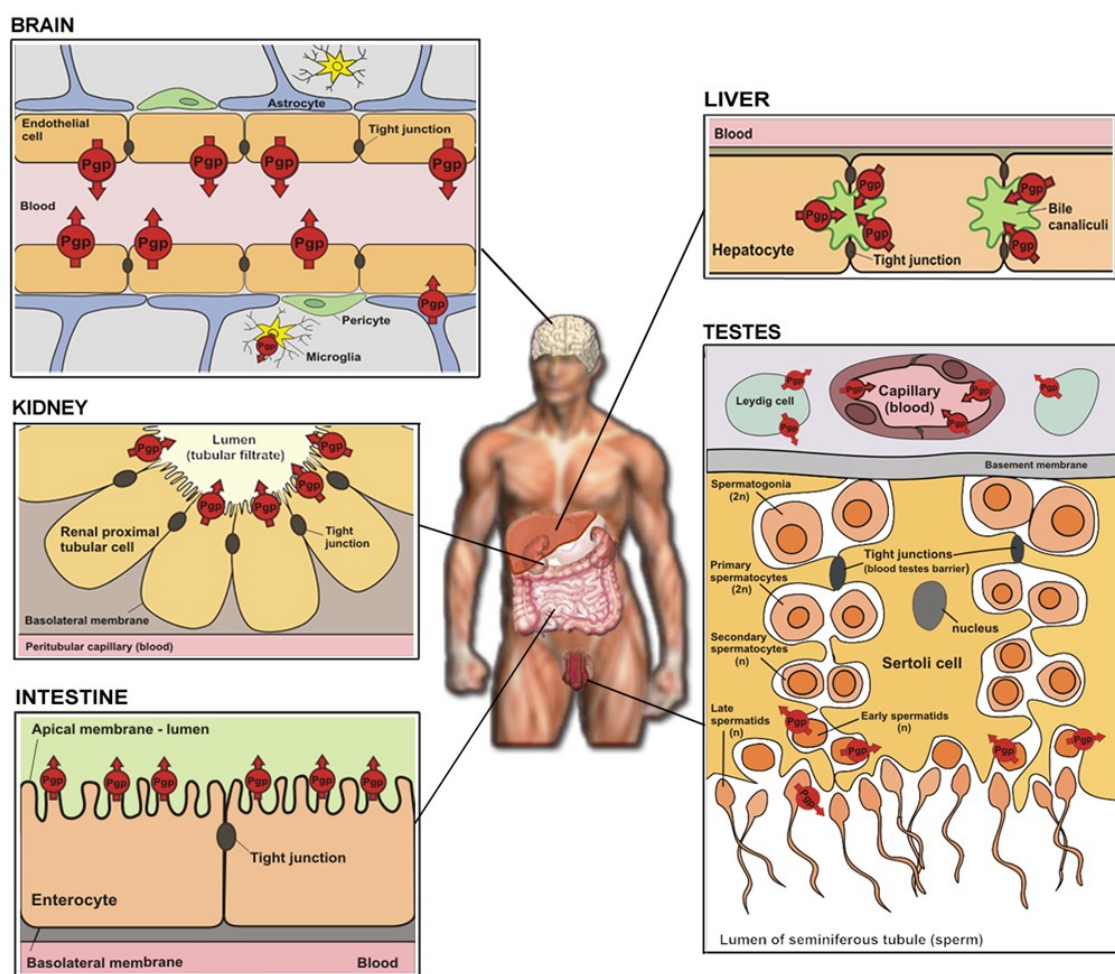


Obrázek 3: Struktura ABCB1 transportéru (převzato z: Vautier et al. 2006).

Přítomnost a aktivita ABCB1 byla původně studována především v souvislosti s výskytem mnohočetné lékové rezistence (MDR) nádorových buněk na cytostatickou léčbu. Později byl ABCB1 objeven a popsán též v mnoha fyziologických nenádorových tkáních jako důležitá složka ochrany organismu a citlivých buněk proti potenciálně toxickému účinku celé řady cizorodých látek (xenobiotik) včetně léčiv (Staud et al. 2010; Szakács et al. 2008).

ABCB1 je lokalizován na apikální straně membrány polarizovaných buněk (Obr. 4) a přenáší své substráty za spotřeby ATP ven z buněk v bazolaterálně - apikálním směru. ABCB1 je přítomný téměř ve většině

fyziologických tkáních, nejvíce však na mikrovilózní membráně epitelu tenkého a tlustého střeva, v apikální membráně hepatocytů i proximálních tubulů ledvin, v kůře nadledvin (Thiebaut et al. 1987), hematoencefalické a hematotestikulární bariéry (Cordon-Cardo et al. 1989) a trofoblastu placenty (Sugawara et al. 1988). Vzhledem k rozmístění ABCB1 v organismu se předpokládá, že svou činností omezuje absorpci léčiv po jejich perorálním podání, distribuci do citlivých částí organismu jako jsou mozek, varlata či plod a urychluje vylučování těchto látek prostřednictvím exkrece do moči a žluči (Fromm 2002).



Obrázek 4: Lokalizace ABCB1 v lidském těle. ABCB1 je exprimován na apikální straně buněk mozku (hematoencefalická bariéra), proximálních tubulů ledvin, buněk střeva, jaterních buněk a buněk ve varleti (hematotestiskulární bariéra) (převzato z: Staud et al. 2010).

Struktura substrátů přenášených ABCB1 transportérem je velmi rozmanitá. Obvykle se jedná o organické molekuly o velikosti 200 Da až 1900 Da obsahující aromatické skupiny. Transportovány jsou však i alifatické nebo cyklické molekuly. Většina těchto látek je bez náboje, v menší míře ale mohou být transportovány i sloučeniny slabě bazického nebo kyselého charakteru (Schinkel & Jonker 2003). Některé klinicky významné substráty a inhibitory ABCB1 jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 1, Tab. 2).

Tabulka 1: Vybrané substráty ABCB1 transportéru.

SUBSTRÁTY			
Antiretrovirotika	Protinádorové látky	Antibiotika	Ostatní
indinavir	daunorubicin	erythromycin	verapamil
nelfinavir	antracykliny	levofloxacin	digoxin
saquinavir	vinka alkaloidy	ofloxacin	atorvastatin
amprenavir			lovastatin
ritonavir			
lopinavir			
TDF			

Zdroj: (Kim et al. 1998; Degorter et al. 2012; Neumanova et al. 2014; Cascorbi 2011)

Tabulka 2: Vybrané inhibitory ABCB1 transportéru.

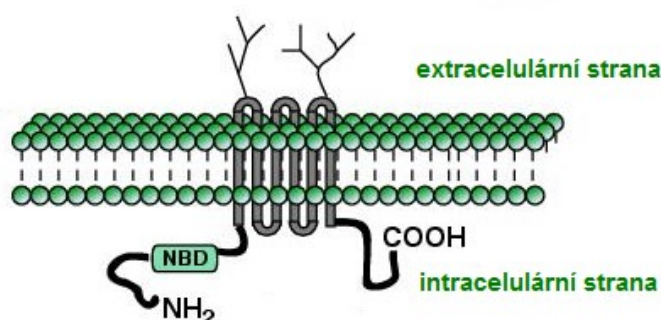
INHIBITORY	
Léčiva	Ostatní látky
cyklosporin A	GF120918
ritonavir	LY335979
verapamil	XR9576
	PSC 833

Zdroj: (Kim et al. 1998; Degorter et al. 2012; Cascorbi 2011)

3.3.2. Breast cancer resistance protein (ABCG2, BCRP)

ABCG2 je členem G podrodiny ABC transportérů. Tento transportér byl téměř naráz popsán několika výzkumnými skupinami. Poprvé byl objeven v buněčné linii odvozené od rakoviny prsu MCF-7/AdrVp, která vykazovala vysokou rezistenci vůči doxorubicinu, daunorubicinu, mitoxantronu a byl proto následně pojmenován jako „breast cancer resistance protein“ (BCRP) (Doyle et al. 1998). Zároveň byla prokázána vysoká exprese tohoto transportéru v placentě, díky čemuž dostal název „placental ABC transporter“ (Allikmets et al. 1998).

ABCG2 je protein kódovaný 663 aminokyselinami a skládá se z šesti transmembránových jednotek a pouze z jedné ATP – vázající jednotky, proto je občas označován za „poloviční transportér“, který pravděpodobně funguje jako homodimer (Obr. 5) (Schinkel & Jonker 2003).



Obrázek 5: Struktura ABCG2 transportéru (převzato z: Vautier et al. 2006).

Lokalizace ABCG2 je velmi podobná jako u ABCB1. Vyskytuje se především v tkáních podílejících se na absorpci a exkreci xenobiotik jako je tenké střevo, ledviny a játra (Staud et al. 2012). Dále je exprimován v mnoha fyziologických bariérách, zajišťujících ochranu citlivých orgánů např. v hematoencefalické a hematotestikulární bariéře (Giacomini et al. 2010). Nejvyšší exprese ABCG2 je však v placentě, kde dokonce převyšuje expresi ABCB1 (Ceckova et al. 2006). Z lokalizace ABCG2 vyplývá, že i jeho úloha v organismu bude velmi podobná s funkcí ABCB1, a to obrana organismu proti škodlivým látkám exogenního i endogenního původu na buněčné, tkáňové a systémové úrovni (Jani et al. 2014). Spolu s ABCB1 můžeme ABCG2 transportér též zařadit mezi hlavní transportéry zodpovědné za lékovou rezistenci v savčích buňkách (Schinkel & Jonker 2003).

Existuje více než 200 substrátů ABCG2, pro které však není dostatek studií o vztahu mezi strukturou a aktivitou (Mao & Unadkat 2015). Tento transportér je schopen aktivně transportovat celou řadu sloučenin (Tab. 3).

Tabulka 3: Vybrané substráty ABCG2 transportéru.

SUBSTRÁTY				
Statiny	Protinádorové látky	Antivirotika	Antibiotika	Ostatní
cerivastatin	topotekan	abakavir	nitrofurantoin	estrogeny
rosuvastatin	irinotekan	acyklovir	ofloxacin	kys.močová
	mitoxantron	zidovudin	ciprofloxacin	
		TDF	norfloxacin	

Zdroj: (Jani et al. 2014; Szakács et al. 2008; Neumanova et al. 2014; Ceckova et al. 2016)

Dosud byl identifikován vysoký počet inhibitorů ABCG2 s rozmanitou strukturou (Tab. 4). Molekulární mechanismus inhibice není zcela znám, ale může být různorodý (Mao & Unadkat 2015).

Tabulka 4: Vybrané inhibitory ABCG2 transportéru.

INHIBITORY			
Imunosupresiva	Antivirotika	Blokátory kalciových kanálů	Antimykotika
cyklosporin A	ritonavir	nitrendipin	ketokonazol
takrolimus	saquinavir	nimodipin	itrakonazol
sirolimus	lopinavir	nicardipin	flukonazol
	nelfinavir	dipyridamol	

Zdroj: (Mao & Unadkat 2015)

3.4. FARMAKOKINETICKÉ LÉKOVÉ INTERAKCE

Při podání více než jednoho léčiva pacientovi současně hrozí riziko rozvoje lékové interakce, tzn., že dojde k ovlivnění chování jedné podané látky látkou jinou. Tyto lékové interakce mohou mít negativní, ale i pozitivní vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku současně podávaných léčiv a jejich výskyt roste s počtem užívaných léčiv.

Farmakokinetické lékové interakce se vyskytují na úrovni absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece a vedou ke změně plazmatických a následně tkáňových koncentrací léčiva v organismu. Důležitými místy vzniku farmakokinetických interakcí jsou enzymy rodiny cytochromu P450 (CYT P450), podílející se na biotransformaci většiny xenobiotik, a transportní mechanismy, které regulují přestup molekul přes membránu buněk, zahrnující solute carrier (SLC) a ATP-binding cassette (ABC) transportéry. Řada zástupců ze skupin antiretrovirálních léčiv jsou prokázanými substráty, inhibitory či induktory jak enzymů z rodiny CYT P450, tak lékových transportérů. Vzhledem k podávání cART a dalších léčiv proti oportunním onemocněním u HIV pacientů, je zde vysoké riziko rozvoje lékových interakcí, které by mohly vyústit v projevy nežádoucích až toxických účinků léčiv nebo selhání antiretrovirální terapie (Kis et al. 2010).

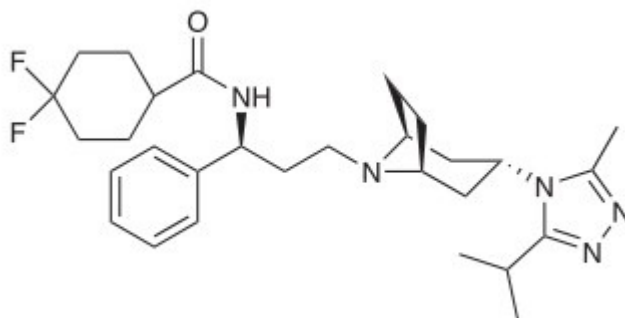
Hlavní regulační lékové agentury, americká Food and Drug Administration (FDA) i evropská European Medicines Agency (EMA) v návaznosti na vznik a doporučení mezinárodního transportérového konsorcia (ITC) zahrnujícího světové odborníky zabývající se výzkumem lékových transportérů (Giacomini et al. 2010), vyžadují u nově schvalovaných léčiv znalost interakce s lékovými transportéry, především s ABCB1 a ABCG2 (Food and Drug Administration 2012). Tyto informace jsou klíčové pro odhad farmakokinetického chování takových látek, ale především i pro odhalení lékových interakcí, jež by mohly mít vliv na účinnost a bezpečnost farmakoterapie.

3.5. MARAVIROK

Maravirok byl prvním antiretrovirotikem ze skupiny inhibitorů vstupu HIV do buňky, který byl v srpnu 2007 schválen americkou agenturou FDA pro použití v kombinaci s dalšími antiretrovirotiky u již dříve léčených dospělých pacientů, kteří jsou infikováni multirezistentním CCR5 - tropním HIV virem s prokázanou virovou replikací (Lieberman-Blum et al. 2008). Pokud se uvažuje o převedení pacienta na léčbu maravirokem, je vždy nutné prokázat infekci právě CCR5 – tropním virem. Zpravidla se tak činí po selhání druhé linie léčby, pak se léčiva kombinují na základě předchozích zkušeností s cART u konkrétního pacienta (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents 2017). Maravirok by měl být vždy použit s minimálně dvěma dalšími plně účinnými antiretrovirotiky. Klinická zkušenost je ale stále omezená, a to zejména s ohledem na údaje o bezpečnosti a posouzení rizika vzniku malignit (MacArthur & Novak 2008).

3.5.1. Chemické vlastnosti

Chemický sumární vzorec maraviroku je $C_{29}H_{41}F_2N_5O$, strukturálně viz Obr. 6. Molekulová hmotnost činí 514, je středně lipofilní a bazického charakteru. Vyznačuje se vysokou rozpustností v celém fyziologickém rozmezí pH 1,0 – 7,5 (Abel et al. 2009).



Obrázek 6: Struktura maraviroku. Chemický 4,4-difluoro-N-((1S)-3-[exo-3-(3-isopropyl-5-methyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]okt-8-yl]-1-fenylpropyl}cyklohexankarboxamid (Abel et al. 2009).

3.5.2. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku maraviroku spočívá v inhibici vstupu HIV do hostitelské buňky přes CCR5 koreceptor tak, že blokuje vazbu HIV-1 gp120 na CCR5, čímž zabrání zprostředkované buněčné fúzi viru do buňky (Invitrogen et al. 2014)

3.5.3. Farmakokinetika

Farmakokinetika perorálně podaného maraviroku není závislá na dávce (MacArthur & Novak 2008). Podávání bezprostředně po jídle s vysokým obsahem tuku vede ke snížení dostupnosti ve srovnání s podáním nalačno (Abel et al. 2009). Absolutní biodostupnost u 100 mg dávky činí 23%, pro 300 mg dávku se předpokládá 33%.

Maravirok je v lidském těle vázán na plazmatické bílkoviny ze 75,5%. Distribuční objem činí 197 litrů. Je označován za substrát ABCB1 a CYP3A4 (jaterní enzym rodiny cytochromu P450), které mohou limitovat jeho biologickou dostupnost v organismu (MacArthur & Novak 2008).

Hlavní metabolické dráhy maraviroku zahrnují oxidaci a N – dealkylaci (Abel et al. 2009). Většina látky ~70% se vylučuje stolicí, zatímco ~20% se vyloučí močí. Z celkového množství se přibližně 33% léku vyloučí v nezměněné formě, zbytek ve formě neaktivních metabolitů (MacArthur & Novak 2008).

3.5.4. Lékové interakce maraviroku

Na rozdíl od mnoha ostatních antivirálních léčiv, u maraviroku není známo, že by výrazně ovlivňoval farmakokinetiku jakéhokoliv současně podávaného léčiva. Nicméně farmakokinetika samotného maraviroku může být v přítomnosti dalších léčiv změněna. Díky možnostem provádět jednoduché a logické úpravy v jeho dávkování však maravirok může být použit s jakýmkoliv jiným kompatibilním antiretrovirálním léčivem (Abel et al. 2009).

V přítomnosti inhibitorů CYP3A4 itrakonazolu, klarithromycinu, azatanaviru nebo ritonaviru, dochází ke zvýšení koncentrace maraviroku v krvi, a proto se doporučuje jeho snížené dávkování (150 mg dvakrát denně). Naopak v přítomnosti induktorů CYP3A4 (např. rifampicin, efavirenz) dochází k poklesu hladin maraviroku a jeho doporučené dávkování se v tomto případě zvyšuje (600mg dvakrát denně). Kombinace látek inhibujících a indukujících CYP3A4

tipranavir/ritonavir farmakokinetiku maraviroku neovlivní (MacArthur & Novak 2008). S ohledem na to, že jsou výše uvedené CYP3A4 inhibující látky zároveň inhibitory i ABCB1, mohla by se na vzniku uvedených interakcí podílet též inhibice tohoto transportéru. Dosavadní znalost ohledně možné interakce maraviroku s ABC transportéry je poměrně omezená, naznačující možný transport maraviroku pomocí ABCB1 u střevních Caco-2 buněk a prokazující, že maravirok se nechová jako induktor ABCB1 ve střevních LS80 buňkách *in vitro* (Zembruski et al. 2011; Walker et al. 2005). Studie Zembruski et al. zároveň uvádí maravirok jako velmi slabý inhibitor ABCG2 s nulovou inhibiční schopností vůči ABCB1. Možnost transportu maraviroku pomocí ABCB1 naznačuje i pozorovaná zvýšená biodostupnost tohoto antiretrovirotika u myši s nulovou expresí *Abcb1* a vyšší transport maraviroku v placentách exprimujících ABCB1 (Walker et al. 2005; Vinot et al. 2013). Znalost interakce maraviroku s lékovými transportéry přitom představuje důležitou součást spektra informací nezbytných pro optimalizaci ART terapeutických režimů a hodnocení lékových interakcí. Možnost úpravy dávkování maraviroku zvyšuje flexibilitu a maximalizuje možnost pacientů přijímat nejúčinnější režim antiretrovirální léčby, čímž se snižuje pravděpodobnost virologického selhání a vzniku rezistence (Abel et al. 2009).

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovit interakční potenciál maraviroku *in vitro* s nejdůležitějšími zástupci ABC transportérů - ABCB1 a ABCG2. Zaměřili jsme se přitom na dva základní cíle: (i) **hodnocení inhibičního vlivu maraviroku vůči ABCB1 a ABCG2**, pro které byla využita *in vitro* metoda založená na sledování změny akumulace Hoechst 33342, fluorescenčního substrátu ABCB1 a ABCG2, v MDCKII buněčné linii stabilně exprimující lidský ABCB1 a ABCG2 a v parentních MDCKII buňkách. Druhým cílem (ii) této práce bylo **zjistit, zda je maravirok též substrátem lidského ABCB1 a ABCG2 *in vitro***. Za tímto účelem byl proveden obousměrný transport maraviroku přes monovrstvy buněčných linií MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII parentní.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. MATERIÁL

5.1.1. Buněčné linie a jejich kultivace

MDCKII (Madine Darby Canine Kidney II) parentní a transdukované cDNA lidského ABCG2 a ABCB1 byly poskytnuty od Dr. Schinkela (The Netherlands Cancer Institute, Nizozemí). Rutinní kultivace všech MDCKII linií probíhala v DMEM s vysokým obsahem glukózy a L-glutaminu, doplněným o 10% FBS. Pro experiment byly všechny buňky použity v rozmezí 5. až 30. pasáže.

Kultivace probíhala při 37°C v atmosféře 5% CO₂, při dosažení 80 - 90% konfluence byly buňky pravidelně pasážovány dle zavedeného postupu. Z kultivační lahve bylo odsáto médium, buňky byly omyty pomocí PBS (37°C) a inkubovány s trypsinem/EDTA při 37°C/5%CO₂ do uvolnění. Následně byly buňky rozsuspendovány v čerstvém médiu a v potřebném poměru přeneseny do nové, popsané kultivační lahve s čerstvým médiem. Zbylé buňky byly dle potřeby využity na pokus nebo zlikvidovány.

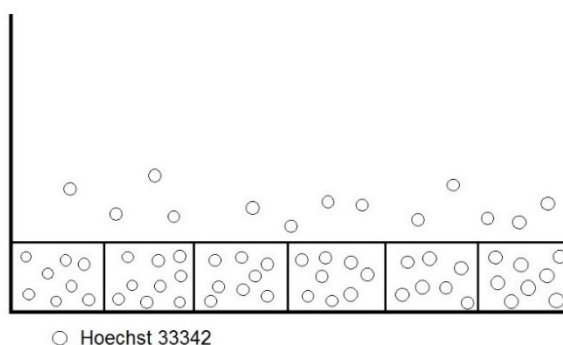
5.1.2. Chemikálie a činidla

- Hoechst 33342 (Sigma Aldrich)
- Opti-MEM ® (Life Technologies)
- PBS (Lonza)
- Ly 335979 (Sigma Aldrich)
- GF 120918 (Sigma Aldrich)
- Ko143 (Sigma Aldrich)
- Maravirok (NIH AIDS Reagent Programe)
- DMSO (Sigma Aldrich)
- DMEM (Sigma Aldrich)
- FBS (Biochrom GmbH)
- [³H] maravirok (Morávek Biochemicals)
- Ultima Gold-LSC Coctail (Sigma Aldrich)
- FITC-dextran (Sigma Aldrich)
- Ly 335979 (Sigma Aldrich)

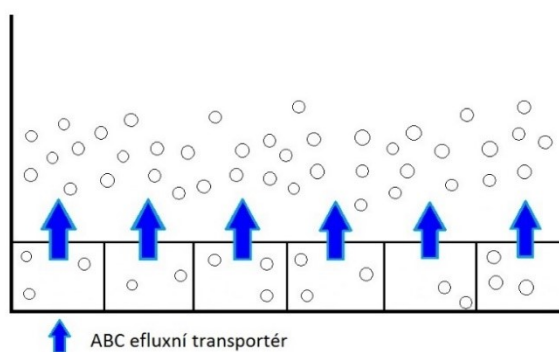
5.2. INHIBIČNÍ STUDIE MARAVIROKU, AKUMULACE HOECHST 33342

5.2.1. Princip

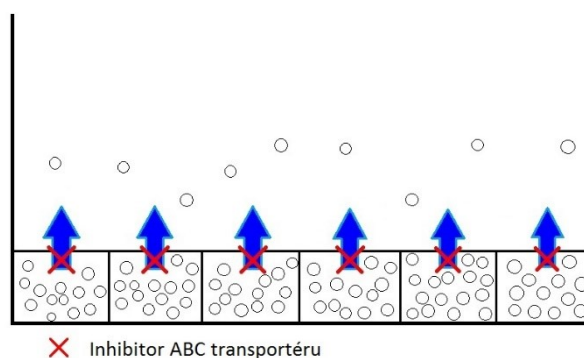
Pro řešení diplomové práce byla využita akumulční metoda s fluorescenčním substrátem lidského ABCB1 a ABCG2 transportéru, HOE (Hoechst 33342), standardně zavedená na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK (Hofman et al. 2012; Cihalova et al. 2013). HOE prochází do buněk, kde se váže s buněčnou DNA, čímž se stává vysoce fluorescenční (Lalande et al. 1981). Princip metody je založený na porovnávání míry akumulace HOE v MDCKII buněčných liniích exprimujících lidský ABCG2 a ABCB1 (Obr. 8) s akumulací v MDCKII parentní linii (Obr. 7), a to v přítomnosti či nepřítomnosti testovaných a kontrolních inhibitorů (Obr. 8 a 9).



Obrázek 7: Akumulace HOE na monovrstvě MDCKII parentních buněk, tj. buněk, které neexprimují žádné z výše uvedených transportérů.

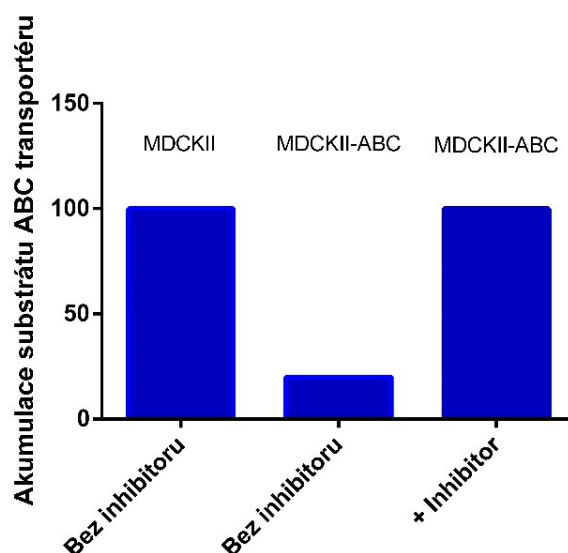


Obrázek 8: Akumulace HOE, v MDCKII buněčné linii exprimující lidský ABCB1 nebo ABCG2. HOE je prostřednictvím těchto transportérů aktivně pumpován ven z buněk, čímž dochází ke snížení intracelulární koncentrace HOE v buňkách a následnému snížení intenzity fluorescence.



Obrázek 9: Akumulace HOE v MDCKII buněčné linii exprimující lidský ABCB1 a ABCG2 v přítomnosti modelového inhibitoru. Inhibitor blokuje funkci efluxních transportérů a tím dochází ke zvýšení akumulace HOE v buňkách na úroveň srovnatelnou s akumulací v MDCKII parentní buněčné linii.

Při akumulační studii je substrát v transportér exprimujících buňkách odčerpáván ven, tj. oproti parentním buňkám se koncentrace nitrobuněčně akumulovaného substrátu sníží. ABC-transportérem mediovaný eflux pak můžeme potvrdit i přidáním odpovídajícího inhibitoru, který opět akumulaci substrátu i v transportér-exprimujících buňkách zvýší, často až zpět na hodnotu pozorovanou u parentních buněk. Takový modelový případ je pak naznačen na Obr. 10.



Obrázek 10: Grafické znázornění modelové situace akumulace HOE v MDCKII parentní buněčné linii s akumulací HOE v MDCKII buněčných liniích exprimujících lidský ABCG2 nebo ABCB1 v přítomnosti či nepřítomnosti inhibitoru.

5.2.2. Postup

Buňky byly počítány v 10x zředěné suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky a následně nasazeny na 96 jamkovou destičku v sázecí hustotě 25×10^3 buněk na jamku a kultivovány po dobu 24 h při 37°C/5% CO₂ do plné konfluence. V den experimentu byl zkontrolován nárůst buněk a následně byla připravena koncentrační řada maraviroku v Opti-MEM v rozmezí 1 - 100 μM. Z jamek bylo odsáto medium a buňky se dvakrát opláchly 100 μl PBS (37°C). Poté byly buňky preinkubovány s maravirokem, s kontrolními inhibitory nebo v čistém Opti-MEM o objemu 90 μl při 37°C/5% CO₂ po dobu 15 min. Všechny vzorky byly testovány v triplicátech. Pro kontrolní inhibici ABCB1 byl použit specifický inhibitor Ly 335979 (1 μM), pro ABCG2 Ko 143 (2 μM) a duální inhibitor ABCB1/ABCG2 GF 120918 (2 μM). Po preinkubaci byl do jamek přidán fluorescenční substrát Hoechst 33342 (50 μg/ml) o objemu 10 μl a ihned bylo zahájeno měření fluorescence v 1 min intervalech po dobu 30 minut při konstantní teplotě 37°C (Genios Plus, Tecan Salzburg, Austria).

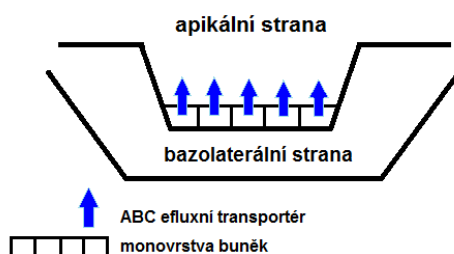
Podmínky měření:

- Měřicí modus: Dno
- Excitační vlnová délka: 350 nm
- Emisní vlnová délka: 465 nm
- Zesílení signálu: 80
- Počet paprsků: 3
- Časová prodleva: 0 μs
- Integrovaný čas: 20 μs
- Počet cyklů: 31
- Délka cyklu: 1 min
- Teplota: 37°C

5.3. OBOUSMĚRNÝ TRANSPORT MARAVIROKU PŘES MONOVRSTVU MDCKII BUNĚČNÝCH LINÍÍ

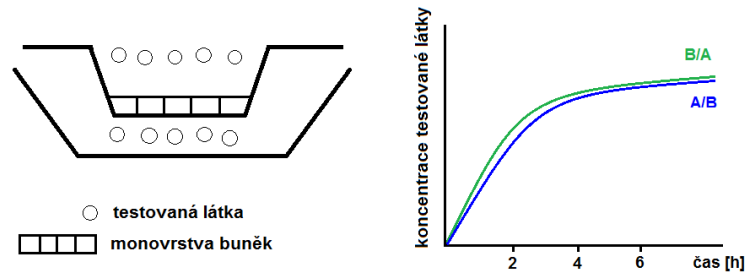
5.3.1. Princip

Pro zjištění substrátové afinity maraviroku k lidskému ABCB1 a ABCG2 transportéru byla použita metoda obousměrného transportu radioaktivně značeného maraviroku přes monovrstvu MDCKII buněk. Princip této metody je založený na schopnosti ABC efluxních transportérů aktivně pumpovat své substráty, vstupující do buněk, ven z těchto buněk za spotřeby energie ve formě ATP. Nasazené MDCKII buňky vytvářejí polarizovanou monovrstvu oddělující bazolaterální a apikální kompartment, ABCB1 a ABCG2 jsou lokalizovány na apikální straně buněčné membrány (Obr. 11). U látek, které jsou substráty ABCB1 nebo ABCG2 transportéru, dochází při jejich aplikaci do spodního, bazolaterálního kompartmentu k mohutnějšímu přestupu látek v bazolaterálně - apikálním (B - A) směru, kdy je transport zajištěn prostřednictvím pasivní difúze a aktivního transportu mediovanému pomocí ABCB1/ABCG2, zatímco transport v opačném apikálně - bazolaterálním směru (A - B) probíhá pouze pasivní difúzí a efluxní aktivita ABCB1/ABCG2 mu brání (Obr. 13). V přítomnosti inhibitoru ABCB1/ABCG2 dochází k útlumu funkce transportérů a snížení přestupu substrátu ve směru B – A (Obr. 14). Pokud látka není substrátem exprimovaného transportéru, je přestup látky v obou směrech vyrovnaný. Testované látky přitom charakterizuje transportní poměr vypočtený na konci transportního experimentu jako $r_t = \text{míra přestupu léčiva v B - A směru} / \text{míra přestupu léčiva v A - B směru}$, který je u substrátů zpravidla ≥ 2 (Giacomini et al. 2010).

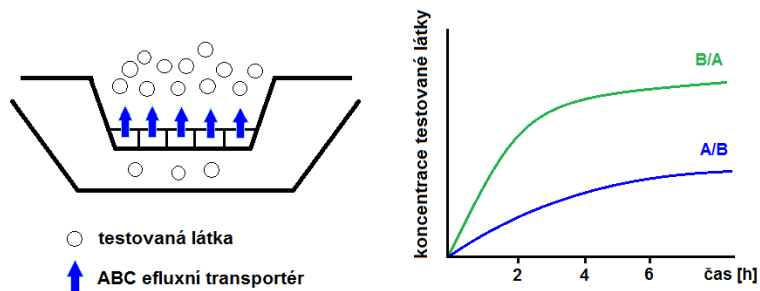


Obrázek 11: Polarizované MDCKII buňky tvoří monovrstvu na polopropustné membráně a v případě exprese ABCB1 nebo ABCG2 tyto transportéry aktivně přenášejí své substráty do apikálního kompartmentu.

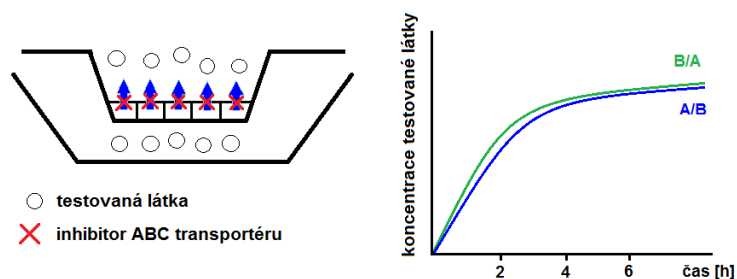
Během experimentu je testovaná látka umístěna do apikálního nebo bazolaterálního kompartmentu, tj. na apikální nebo bazolaterální stranu buněčné membrány a sleduje se její prostup na stranu druhou. Z výsledků přenesených do grafů se pak odečítají výsledky.



Obrázek 12: Parentní linie MDCKII buněk neexprimuje lidský ABCB1 ani ABCG2, tudíž nedochází k aktivnímu transportu testované látky a rychlost transportu je v obou směrech srovnatelná. Na grafickém znázornění (vpravo) je patrné, že transportní poměr r_t naměřených koncentrací v akceptorovém kompartmentu B-A/A-B v šesté hodině je ≈ 1 .



Obrázek 13: U buněčných linií, které exprimují lidský ABCB1, ABCG2 na apikální straně buněčné membrány dochází k výraznějšímu přestupu jejich substrátů ve směru B-A. Poměr r_t naměřených koncentrací v akceptorovém kompartmentu B-A/A-B v šesté hodině je >1 .



Obrázek 14: V přítomnosti inhibitoru ABC transportéru nedochází k aktivnímu transportu testované látky a rychlost transportu je tedy v obou směrech srovnatelná. Transportní poměr r_t naměřených koncentrací v akceptorovém kompartmentu B-A/A-B v šesté hodině je ≈ 1 .

5.3.2. Metodika

Buňky byly počítány v 10x zředěné suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky a následně nasazeny na mikroporózní polykarbonátovou membránu (Transwell 3414; Costar Corning, New York, USA) v sázecí hustotě $1,5 \times 10^6$ buněk na jamku ve 2 ml DMEM. Do spodního kompartmentu byly napipetovány též 2 ml DMEM. Buňky byly kultivovány při 37°C/5% CO₂ po dobu 72 – 96 hodin do plné konfluence, každých 24 hodin bylo měněno médium.

V den experimentu bylo odsáto médium z dolního kompartmentu, zkontrolována souvislost monovrstvy a následně bylo odsáto médium i z horního kompartmentu. Buňky se dvakrát opláchly 2 ml PBS (37°C) a poté byly preinkubovány s roztoky kontrolních inhibitorů nebo v čistém Opti-MEM o objemu 2 ml při 37°C/5% CO₂ po dobu 15 min. Pro inhibici ABCB1 byl použit modelový inhibitor Ly 335979 (1 μM). Po preinkubaci bylo médium odsáto. Transportní studie byla zahájena přidáním 2ml roztoku radioaktivně značeného [³H] maraviroku (23 nM) v Opti-MEM s nebo bez inhibitoru na apikální nebo bazolaterální stranu. Na opačnou stranu byly napipetovány 2 ml čistého Opti-MEM. Buňky byly inkubovány při 37°C/5% CO₂. Vzorky o objemu 100 μl byly odebírány ve 2., 4. a 6. hodině. Radioaktivita byla měřena po přidání 1 ml scintilačního roztoku Ultima Golg-LSC Coctail (Sigma Aldrich) pomocí přístroje Tri-Carb 2900 TR (PerkinElmer).

Po ukončení experimentu byly odsáty testované roztoky a byla zkontrolována souvislost monovrstvy pomocí transportu fluorescenčně značeným dextranem o molekulové hmotnosti 10 kD. Do vrchního kompartmentu byly napipetovány 2 ml roztoku fluorescenční látky FITC-dextranu (0,4 mg/ml), do spodního kompartmentu byl přidán čistý Opti-MEM. Po 60 minutách byly odebrány vzorky (100 μl) ze spodního kompartmentu a změřena fluorescence na přístroji Genios Plus, Tecan Salzburg, Austria. Vrstva buněk byla považována za dostatečně těsnou, pokud byla míra přestup FITC-dextranu ≤ 1%.

Pro vyhodnocení experimentu byl vypočítán transportní poměr (r_t) udávající poměr přestupu maraviroku v B - A/A - B směru v 6. hodině experimentu.

5.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechna data byla vyhodnocena užitím softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California USA).

Statistická významnost při hodnocení účinku inhibitoru v akumulární i transportní studii byla stanovena pomocí one-way ANOVA testu s následujícím Dunnettovým posttestem: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

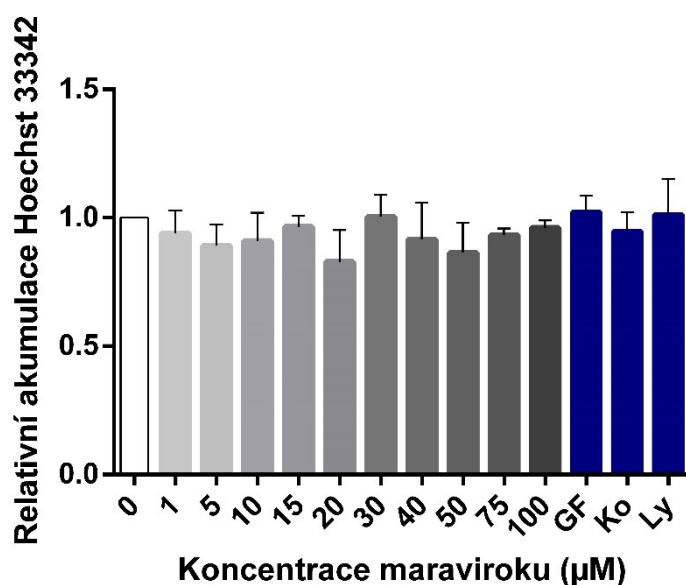
Pro vyhodnocení transportu maraviroku v B - A směru byl použit parametrický studentův t-test.

6. VÝSLEDKY

6.1. INHIBIČNÍ STUDIE

6.1.1. MDCKII – parentní linie

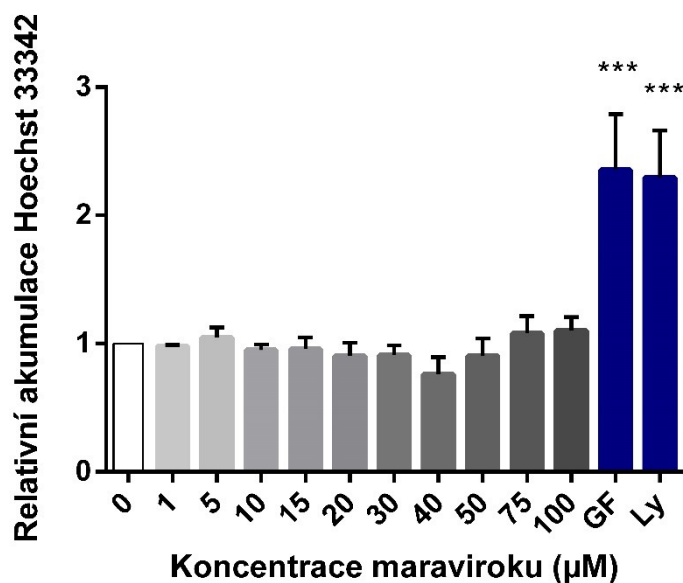
Po provedení akumulční studie s fluorescenčním substrátem ABCB1 a ABCG2 transportérů, Hoechst 33342, nebyly pozorovány žádné změny v akumulaci HOE v přítomnosti maraviroku ani kontrolních inhibitorů Ko 143 (ABCG2), Ly 335979 (ABCB1) a GF 120918 (ABCG2/ABCB1). Tato data (Obr. 15) slouží jako kontrola, že maravirok ani modelové inhibitory neovlivňují transport HOE v parentní buněčné linii *in vitro*, a že případné změny akumulace HOE v MDCKII-ABCB1 a ABCG2 buněčné linii jsou způsobeny výhradně přítomností těchto efluxních transportérů.



Obrázek 15: Grafické znázornění akumulace HOE v MDCKII parentní linii v přítomnosti maraviroku, vztažené k neinhibované kontrole. Modelové inhibitory GF 120918, Ly 335979 a Ko 143 slouží jako pozitivní kontrola. Data udávají průměrnou hodnotu \pm SD vždy nejméně tří experimentů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena pomocí one-way ANOVA testu s následujícím Dunnettovým post-testem: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

6.1.2. MDCKII – ABCB1

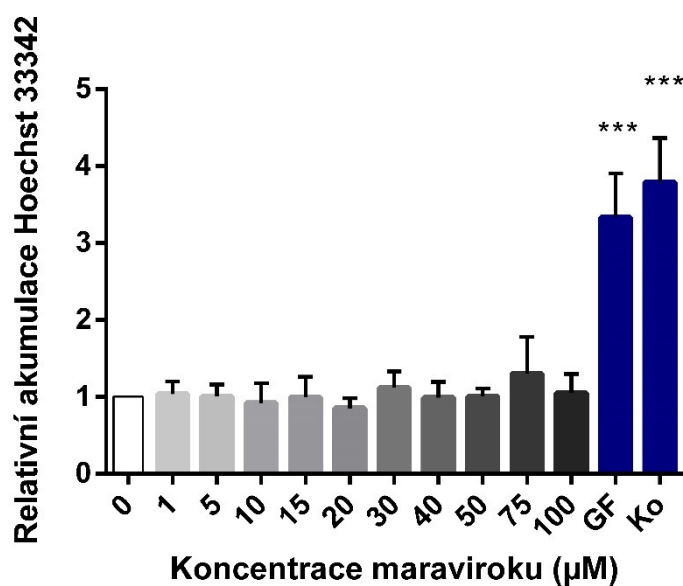
V akumuláční studii s Hoechst 33342, fluorescenčním substrátem ABCB1, nebyl pozorován žádný inhibiční vliv maraviroku na efluxní transport HOE z MDCKII-ABCB1 buněk oproti kontrolním inhibitorům Ly 335979 a GF 120918 (Obr. 16). Tato data prokazují, že maravirok není inhibitorem ABCB1 transportéru *in vitro*.



Obrázek 16: Grafické znázornění inhibice efluxu HOE maravirokem z MDCKII-ABCB1 buněk. Modelové inhibitory Ly 335979 a GF 120918 byly použity jako pozitivní kontroly. Data udávají průměrnou hodnotu \pm SD vždy nejméně tří experimentů provedených v triplikátech. Statistická významnost byla stanovena pomocí one-way ANOVA testu s následujícím Dunnettovým post-testem: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

6.1.3. MDCKII – ABCG2

Po provedení akumulční studie s fluorescenčním substrátem ABCG2, Hoechst 33342, nebyl pozorován žádný inhibiční vliv maraviroku na efluxní transport HOE z MDCKII - ABCG2 buněk, na rozdíl od kontrolních inhibitorů Ko 143 a GF 120918 (Obr. 17). Tato data naznačují, že maravirok není inhibitorem ABCG2 transportéru *in vitro*.



Obrázek 17: Grafické znázornění inhibice efluxu HOE maravirokem z MDCKII - ABCG2 buněk. Modelové inhibitory Ko 143 a GF 120918 byly použity jako pozitivní kontroly. Data udávají průměrnou hodnotu \pm SD vždy nejméně tří experimentů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena pomocí one-way ANOVA testu s následujícím Dunnettovým posttestem: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

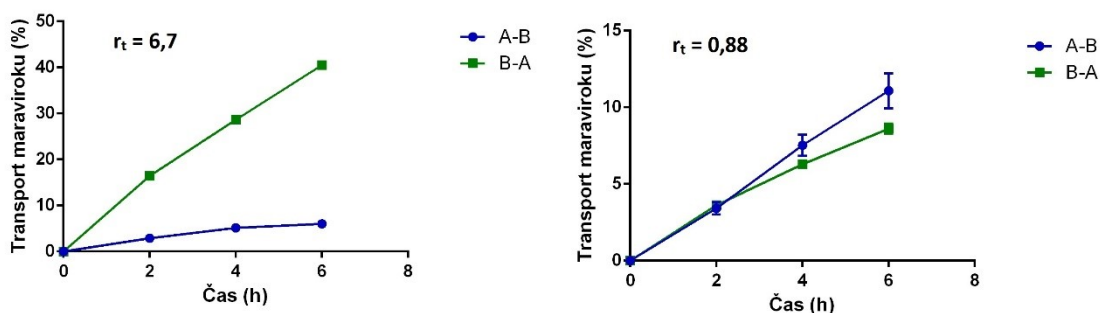
6.2. TRANSPORTNÍ STUDIE MARAVIROKU

6.2.1. MDCKII – ABCB1

Na základě již publikovaných dat (Walker et al. 2005; Vinot et al. 2013) a pilotních *in vivo* experimentů na potkanech (dosud nepublikovaná data) jsme předpokládali transport maraviroku prostřednictvím lidského ABCB1 v MDCKII - ABCB1 buněčné linii. Nejdříve jsme provedli transportní studii pouze s [³H] maravirokem, kde byl skutečně pozorován výrazně vyšší transport maraviroku ve směru B - A oproti opačnému A - B směru. Následně spočítaný transportní poměr r_t v šesté hodině byl roven 6,7 (Obr. 18).

Při použití modelového inhibitoru ABCB1 Ly 335979 došlo k úplné redukci transportu [³H] maraviroku a r_t byl snížen na 0,88 (Obr. 18).

Tato data skutečně naznačují afinitu maraviroku jako substrátu k ABCB1, který ovlivňuje jeho transport přes monovrstvu MDCKII-buněčné linie.

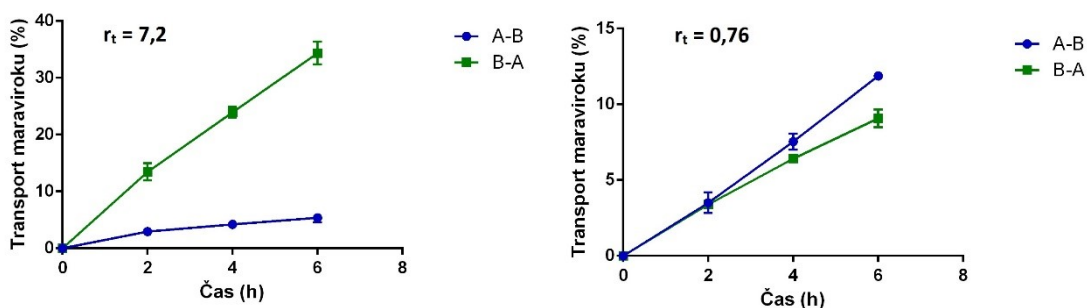


Obrázek 18: Grafické znázornění obousměrného transportu [³H] maraviroku v MDCKII - ABCB1 buněčné linii v nepřítomnosti (vlevo) a přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1, Ly 335979 (vpravo).

6.2.2. MDCKII – parentní linie

Následně jsme provedli transportní studii na parentní MDCKII buněčné linii, která neexprimuje lidský ABCB1 a tudíž slouží jako kontrolní linie. Po dokončení studie s [³H] maraviroem byl však též pozorován vyšší transport maraviroku ve směru B - A a poměr r_t v šesté hodině byl roven 7,2 (Obr. 19).

Vlivem kontrolního inhibitoru ABCB1 Ly 335979, došlo opět ke snížení transportu maraviroku s poklesem poměru r_t na 0,7 (Obr. 19). Tato data naznačují, že maravirok je pravděpodobně transportován též endogenním Abcb1 exprimovaným v MDCKII parentní linii.

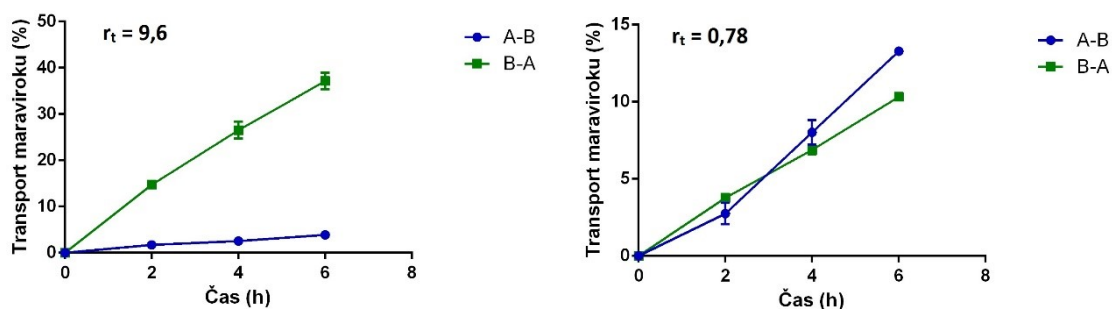


Obrázek 19: Grafické znázornění obousměrného transportu maraviroku v MDCKII parentní linii v nepřítomnosti (vlevo) a přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1/Abcb1, Ly 335979 (vpravo).

6.2.3. MDCKII – ABCG2

Po provedení transportní studie s [³H] maraviroem na MDCKII – ABCG2 buněčné linii byl opět pozorován zvýšený transport maraviroku ve směru B - A. Poměr r_t v šesté hodině byl roven 9,6 (Obr. 20).

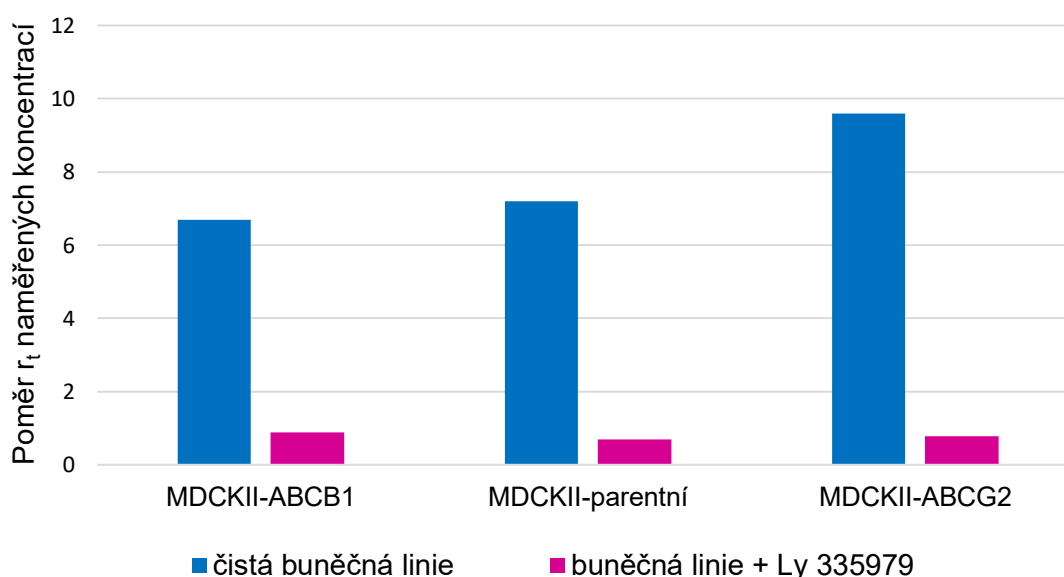
Pro vyloučení vlivu endogenního transportu jsme další pokus provedli na pozadí specifického inhibitoru pro ABCB1, Ly 335979. Tento inhibitor zcela redukoval zvýšený transport maraviroku ve směru B - A a poměr r_t byl roven 0,78 (Obr. 20). Vzhledem ke specifitě použitého inhibitoru k ABCB1 předpokládáme, že ABCG2 transportér nebyl nijak ovlivněn a na základě získaných dat lze předpokládat, že maravirok není substrátem lidského ABCG2 *in vitro*.



Obrázek 20: Grafické znázornění obousměrného transportu maraviroku v MDCKII - ABCG2 buněčné linii v nepřítomnosti (vlevo) a přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1, Ly 335979 (vpravo).

6.2.4. Souhrn výsledků transportní studie maraviroku

Z provedených transportních studií s [³H] maravirokem lze konstatovat, že ve všech použitých buněčných liniích byl pozorován zvýšený transport maraviroku ve směru B - A, tedy poměr r_t naměřených koncentrací v akceptorovém kompartmentu B - A/A - B v šesté hodině je výrazně >1. Po přidání specifického inhibitoru pro ABCB1/Abcb1, Ly 335979, došlo vždy ke kompletní redukci tohoto transportu, což se projevilo snížením poměru r_t naměřených koncentrací v akceptorovém kompartmentu B - A/A - B v šesté hodině na hodnotu ≈ 1 . Obr. 21 pak graficky zobrazuje souhrnně všechny hodnoty transportních poměrů získaných v rámci této práce.



Obrázek 21: Grafické znázornění poměrů r_t získaných z transportních studií ve třech různých buněčných liniích v nepřítomnosti a přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1/Abcb1, Ly 335979.

7. DISKUZE

Maravirok je antiretrovirotikum používané v cART především po selhání předchozí léčby. Nevykazuje žádnou zkříženou rezistenci s jinými antiretrovirálními léčivými a proto je vhodný pro kombinovanou léčbu u pacientů s prokázaným CCR5 – tropní infekcí (MacArthur & Novak 2008). V rámci cART dochází často k lékovým interakcím, které mohou vést k subterapeutickým nebo toxickým koncentracím léčiv ve tkáních. Jedním z míst vzniku LI jsou ABC transportéry ABCB1 a ABCG2, proto se vyžaduje znalost, zda je látka substrátem/inhibitorem daného transportéru (Giacomini et al. 2010).

Podle našich výsledků akumulací studie s HOE látka není inhibitorem ABCB1 ani ABCG2. Tato data potvrzují výstupy práce Zemruski et al. (2011), která pro testování inhibice využila metodu s fluorescenčním calceinem AM a pheophorbidem A. Autoři této práce zmiňují údajně pozorovaný inhibiční vliv maraviroku vůči ABCG2 při podání ve vysokých, blíže nespecifikovaných koncentracích. Naše práce však tuto inhibici při testování maraviroku v koncentračním rozsahu 0-100 μM nepotvrdila. Vyšší koncentrace pak už nebyly pro naše testování použitelné pro omezenou rozpustnost maraviroku ve vodném prostředí vyžadující zvýšení podílu DMSO jako solventu na koncentraci, jež by byla pro buňky již cytotoxická. Navíc koncentrace maraviroku $> 100 \mu\text{M}$ už nejsou při běžném dávkování maraviroku dosažitelné a dle doporučení ITC nemá testování jejich inhibičního vlivu vůči transportéru ani žádoucí opodstatnění (Giacomini et al. 2010).

Řada antiretrovirotik je substrátem ABCB1 a/nebo ABCG2, proto je vhodné studium jejich vzájemné interakce (Alam et al. 2016). Na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK byly prokázány jako substráty ABCB1 i ABCG2 abakavir (Neumanova et al. 2015), zidovudin (Neumanova et al. 2016) a proléčivo tenofoviru, tenofovir disoproxil fumarát (Neumanova et al. 2014). Z našich výsledků lze pak konstatovat, že maravirok by v kombinaci s těmito látkami neměl ovlivňovat jejich farmakokinetiku.

Druhá část naší studie se zaměřovala na popis maraviroku jako substrátu ABCB1 a ABCG2 transportérů. Předpoklad, že by farmakokinetika maraviroku mohla být ovlivněna ABCB1 transportérem, jež popsala, že je maravirok substrátem myšího P - glykoproteinu, kódovaného *Abcb1* geny (Walker et al.

2005). Toto tvrzení se shoduje se studií na duálně perfundované placentě potkana provedené na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK, která potvrzuje maravirok jako substrát potkaního P - glykoproteinu (dosud nepublikovaná data). U lidského ABCB1 se výsledná data rozcházejí. Walker et al. považuje maravirok za substrát ABCB1 na základě asymetrického transportu přes monovrstvu Caco-2 buněk a jeho snížení při použití ABCB1 inhibitoru, zatímco naše studie transport maraviroku pomocí ABCB1 vůbec nepotvrzuje. Autoři výše uvedené práce ale u Caco-2 buněk použili verapamil a derivát cyklosporinu, oba velmi nespecifické inhibitory ABCB1 schopné blokovat aktivitu celé řady dalších transportérů. Proto předpokládáme, že v případě monovrstvy Caco-2 buněk se jednalo o transport maraviroku zprostředkovaný jiným transportérem než ABCB1. Práce Walker et al. dále zahrnuje studium farmakokinetiky maraviroku u psů a na základě získaných dat usuzuje, že maravirok není substrátem psího Abcb1. Naše studie na MDCKII buňkách odvozených od tubulárních ledvinných buněk kokršpaněla jednoznačně transport maraviroku pomocí endogenního Abcb1 prokazuje. Rozdíl mezi oběma studii může být způsobený odlišností exprese Abcb1 u psů rozdílné rasy (Gramer et al. 2011).

Maravirok je dále popsán jako pravděpodobný substrát lidského ABCB1 ve studii Vinot et al. (2013), který pozoroval vyšší transport maraviroku přes lidskou placentu ve fetomaternálním směru oproti směru z matky do plodu. Tuto asymetrii dává do souvislosti s vyšší expresí ABCB1 a dalších ABC transportérů v placentě, nicméně vzhledem k nepřítomnosti kontrolních studií s ABCB1 inhibitorem je toto tvrzení pouze nepřímé a nedostatečně průkazné. Klinická studie provedená na interakci maraviroku se současně podávanými inhibitory ABCB1/CYP3A4, kdy dochází ke zvýšení koncentrace maraviroku v krvi, tvrdí, že je maravirok substrátem ABCB1 i CYP3A4 (Abel et al. 2008). Z našich výsledků je tato skutečnost nepravděpodobná a nejspíš šlo především o interakci na CYP3A4. Dosud nepublikovaná data studie provedené na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK ukazují, že transport maraviroku nebyl ovlivněn ani v A431 rezistentních buňkách exprimujících ABCB1, což potvrzuje výsledky publikované v této diplomové práci.

8. ZÁVĚR

Maravirok je slibné léčivo ze skupiny inhibitorů vstupu HIV do buňky používané v cART. V současnosti není podáván v rámci první linie terapie, ale stejně jako ostatní vyvíjené látky téže skupiny může hrát velkou roli především v léčbě pacientů rezistentních na dočasnou léčbu.

Řada léčiv podávaných v rámci cART je substrátem a/nebo inhibitorem ABCB1 a ABCG2 transportérů, proto jsme v této práci hodnotili riziko lékových interakcí maraviroku na úrovni těchto transportérů. Na základě našich výsledků je možné konstatovat, že farmakokinetické interakce mezi maravirokem a substráty ABCB1 a ABCG2 v rámci cART jsou velice nepravděpodobné, jelikož u maraviroku nebyl prokázán inhibiční vliv ani na jeden z těchto transportérů.

Obecně přijímaný fakt, že je maravirok substrátem ABCB1 (MacArthur & Novak 2008; Abel et al. 2008), naše studie významně zpochybňuje a naznačuje afinitu pouze k psímu (endogennímu) Abcb1, zatímco transport maraviroku u lidského ABCB1 je velice nepravděpodobný. Stejným způsobem se maravirok chová i v přítomnosti ABCG2, tedy není jeho substrátem.

Interakce maraviroku s ABCB1 a ABCG2 je podle našich konečných výsledků nepravděpodobná a lze tedy konstatovat, že se jedná o relativně bezpečné léčivo s nízkým interakčním potenciálem na těchto transportérech. Tato data pomáhají objasnit farmakokinetické chování maraviroku v organismu a mohou pomoci při dalších studiích LI tohoto léčiva.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Abel, S. et al., 2008. Effects of CYP3A4 inhibitors on the pharmacokinetics of maraviroc in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65 (SUPPL. 1), pp.27–37.
- Abel, S., Back, D.J. & Vourvahis, M., 2009. Maraviroc: Pharmacokinetics and drug interactions. *Antiviral Therapy*, 14(5), pp.607–618.
- Alam, C. et al., 2016. Role and modulation of drug transporters in HIV-1 therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103, pp.121–143.
- Allikmets, R. et al., 1998. A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *Cancer research* pp.5337–5339.
- Azijn, H. et al., 2010. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), pp.718–727.
- Badowski, M.E. et al., 2016. New Antiretroviral Treatment for HIV. *Infectious Diseases and Therapy*, pp.329–352.
- Briz, V., Poveda, E. & Soriano, V., 2006. HIV entry inhibitors: Mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), pp.619–627.
- Cascorbi, I., 2011. P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations. *Handbook of experimental pharmacology* ISSN 0171-2004, 201, pp.261–283.
- Ceckova, M. et al., 2006. Expression and Functional Activity of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp , Abcg2) Transporter in the Human. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, pp.58–65.
- Ceckova, M. et al., 2016. Role of ABC and solute carrier transporters in the placental transport of lamivudine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(9), pp.5563–5572.

- Cihalova D, Hofman J, Ceckova M, Staud F, 2013. Purvalanol A, Olomoucine II and Roscovitine Inhibit ABCB1 Transporter and Synergistically Potentiate Cytotoxic Effects of Daunorubicin In Vitro. *PLoS ONE* 8(12): e83467. doi:10.1371/journal.pone.0083467.
- Cordon-Cardo, C. et al., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(2), pp.695–8.
- Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G., 2001. The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42, pp.1007–1017.
- Degorter, M.K. et al., 2012. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, pp.249–73.
- Doyle, L.A. et al., 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), pp.15665–15670.
- Food and Drug Administration, 2012. Guidance for industry. Drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations., (February), p.79.
- Fromm, M.F., 2002. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(10), pp.1295–1310.
- Giacomini, K.M. et al., 2010. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), pp.215–236.
- Gramer, I. et al., 2011. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Veterinary Journal*, 189(1), pp.67–71.
- Greenberg, M.L. & Cammack, N., 2004. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), pp.333–340.
- Hofman, J. et al., 2012. Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 transporter in vitro and in situ and synergistically potentiate cytostatic effect of mitoxantrone. *Pharmacological Research*, 65(3), pp.312–319.

- Invitrogen et al., 2014. Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Nature*, 22(3), pp.1–8.
- Jani, M. et al., 2014. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Archives of Toxicology*, 88(6), pp.1205–1248.
- Juliano, R.L. & Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembranes*, 455(1), pp.152–162.
- Kim, R.B. et al., 1998. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 101(2), pp.289–294.
- Kis, O. et al., 2010. The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(1), pp.22–35.
- Lalande, M.E., Ling, V. & Miller, R.G., 1981. Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells C-O. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 78(1), pp.363–367.
- Lieberman-Blum, S.S., Fung, H.B. & Bandres, J.C., 2008. Maraviroc: A CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clinical Therapeutics*, 30(7), pp.1228–1250.
- Ling V., 1987. Multidrug resistance and the P-glycoprotein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 507, pp.7–8.
- MacArthur, R.D. & Novak, R.M., 2008. Reviews Of Anti-infective Agents: Maraviroc: The First of a New Class of Antiretroviral Agents. *Clinical Infectious Diseases*, 47(2), pp.236–241.

- Mao, Q. & Unadkat, J., 2015. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport. *The AAPS Journal*, 7(1), pp.E118–E133.
- Neumanova, Z. et al., 2015. Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir. *Reproductive Toxicology*, 57, pp.176–182.
- Neumanova, Z. et al., 2014. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *Aids*, 28(1), pp.9–17.
- Neumanova, Z. et al., 2016. Role of ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC5 transporters in placental passage of zidovudine. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 37, pp.28–38.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Dostupné na: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Přístup: 4. 4. 2017
- Rang, H. P. a M. Maureen DALE (eds.). *Rang and Dale's pharmacology*. 7th ed. New York: Elsevier/Churchill Livingstone, 2012. ISBN 978-1-4377-1933-8., pp. 638-648
- Salavec, M., Bo, V. & Bo, P., 2011. HIV infekce – historie , patogeneze , klinické manifestace. *Česko-slovenská dermatologie*, (2), pp.67–81.
- Schinkel, A.H. & Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp.138–153.
- Staud, F. et al., 2010. Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. *Multi-Drug Resistance in Cancer*, 596, pp.199–222.
- Staud, F., Cervený, L. & Cecková, M., 2012. Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), pp.736–763.

- Sugawara, I. et al., 1988. Tissue Distribution of P-Glycoprotein Encoded by a Multidrug-Resistant Gene as Revealed by a Monoclonal Antibody, mrk 16. *Cancer Research*, 48(7), pp.1926–1929.
- Szakács, G. et al., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug discovery today*, 13(9–10), pp.379–93.
- Thiebaut, F. et al., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp.7735–7738.
- Tilton, J.C. & Doms, R.W., 2010. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research*, 85(1), pp.91–100.
- UNAIDS, 2016. Global AIDS Update 2016. *World Health Organization*, (March), p.422. Dostupné na:
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf Přístup: 15. 4. 2017
- Vandekerckhove, L., Verhofstede, C. & Vogelaers, D., 2008. Maraviroc: Integration of a new antiretroviral drug class into clinical practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), pp.1187–1190.
- Vautier, S. et al., 2006. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique: Implication dans les maladies neurologiques et leurs traitements. *Journal de Pharmacie Clinique*, 25(4), pp.225–235.
- Vinot, C. et al., 2013. Placental transfer of maraviroc in an ex vivo human cotyledon perfusion model and influence of ABC transporter expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), pp.1415–1420.
- Walker, D.K. et al., 2005. Species Differences in the Disposition of the Ccr5 Antagonist , Uk-427 , 857 , a New Potential Treatment for Hiv Abstract : *Drug Metab Dispos*, 33(4), pp.587–595.

World Health Organization, 2016. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. *World Health Organization*, p.155 p.

Zembruski, N.C.L. et al., 2011. Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), pp.802–812.