

УДК 615.011; 576.08

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И Pgp-ТРАНСПОРТА ФОСФАЗИДА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛИ Caco-2

Д.Ю. Гребенкин<sup>1,2\*</sup>, Я.М. Станишевский<sup>1</sup>, И.Е. Шохин<sup>3</sup>, А.М. Стойнова<sup>1</sup>,  
М.А. Карпова<sup>4</sup>, А.Г. Корякова<sup>4</sup>, А.В. Рябова<sup>2</sup>, Б.В. Бровченко<sup>5</sup>, А.А. Смирнов<sup>5</sup>

**Резюме.** Исследована кишечная проницаемость фосфазида *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 в апикально-базолатеральном (А-В) и базолатерально-апикальном (В-А) направлениях с добавлением и без добавления ингибитора трансмембранного эффлюкс-транспортёра Pgp циклоспорина А. В качестве контрольных веществ использовались ранитидин и пропранолол. В результате эксперимента были получены величины коэффициентов кажущейся кишечной проницаемости Papp для исследуемого и контрольных веществ. Также полученные данные были сопоставлены с величинами (А) log P для исследуемого и контрольных веществ. На основании результатов исследования можно сделать предположение о низкой кишечной проницаемости фосфазида по классификации БКС. Эксперимент также показал сродство фосфазида к эффлюкс-транспортёрам Pgp.

**Ключевые слова:** БКС, всасываемость, Caco-2, фосфазид.

### Caco-2 INTESTINAL PERMEABILITY AND Pgp-AFFINITY OF PHOSPHAZIDE

D.Yu. Grebenkin<sup>1,2\*</sup>, Ya.M. Stanishevskiy<sup>1</sup>, I.E. Shohin<sup>3</sup>, A.M. Stoinova<sup>1</sup>,  
M.A. Karpova<sup>4</sup>, A.G. Koryakova<sup>4</sup>, A.V. Ryabova<sup>2</sup>, B.V. Brovchenko<sup>5</sup>, A.A. Smirnov<sup>5</sup>

**Abstract.** In this work the intestinal permeability of phosphazide *in vitro* was investigated using Caco-2 cell model in apical-basolateral (A-B) and basolateral-apical (B-A) directions as well as with the option of adding of P-glycoprotein (Pgp) inhibitor cyclosporine A. The following standard substances were used: ranitidine and propranolol. Papp values of test and standard substances were obtained. The obtained data were compared with the values (A) log P for the test and standard substances. According the results of this study, the phosphatide presumably has a low intestinal permeability in terms of BCS. The affinity of phosphazide for the efflux transporter Pgp was demonstrated.

**Keywords:** BCS, permeability, Caco-2, Phosphazide.

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ООО «Экзакт Лабс», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20

3 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20

4 – ООО «Научно-исследовательский институт ХимРар», 141400, Россия, Московская обл., г. Химки, ул. Рабочая, д. 2а, к. 1

5 – ООО «АЗТ ФАРМА К.В.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А

1 – Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – ExacteLabs Company, 20, Nauchniy proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchniy proezd, Moscow, 117246, Russia

4 – LLC «Research Institute ChemRar», 2a/1, Rabochaya str., Khimki, Moscow region, 141400, Russia

5 – LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

\* адресат для переписки:

E-mail: gredmitrij93@gmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение кишечной проницаемости в модели Caco-2 модели входит в панель тестов ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion; абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция), является «золотым стандартом» среди методов оценки кишечной проницаемости *in vitro* [1], а также тестом, на основании результатов которого руководство FDA позволяет установить проницаемость по биофармацевтической классификационной системе (БКС) путём сравнения с контрольными веществами [2]. В качестве конт-

рольных веществ в настоящей работе использовались: ранитидин (стандарт низкой проницаемости по БКС, биодоступность  $f_a=50-84$ ), пропранолол (стандарт высокой проницаемости по БКС, биодоступность  $f_a \geq 85\%$ ) [2].

Фосфазид (торговое название монопрепарата – Никавир®) – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, модифицированный аналог природного нуклеозида тимидина, противовирусное средство, используемое в терапии ВИЧ и гепатита В. Фосфазид – это оригинальный отечественный препарат, успешно прошедший кли-

нические исследования и зарегистрированный в Российской Федерации в 1999 году. За время применения лекарственный препарат продемонстрировал свою эффективность и безопасность [3]. Препарат удостоен государственной премии РФ в области науки и техники за 2000-й год (Указ Президента Российской Федерации от 26 декабря 2000 года № 2084 «О присуждении Государственных премий Российской Федерации 2000 года в области науки и техники»).

Согласно литературным данным, фосфазид относится к классу 3 БКС, то есть для него установлена низкая кишечная проницаемость [4, 5]. Новые экспериментальные данные в этой области, полученные с использованием культур клеток, позволят более подробно изучить механизмы, обуславливающие особенности фармакокинетики и фармакодинамики фосфазиды.

Целью настоящей работы являлось экспериментальное подтверждение класса кишечной проницаемости по БКС для лекарственного средства фосфазид, оценка его сродства к эффлюкс-транспортёру Pgp (Р-гликопротеину) и сопоставление полученных данных с величиной рассчитанного показателя гидрофобности (A)  $\log P$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Оборудование и материалы

- Линия клеток Caco-2 (ATCC, кат. № HTB-37, США).
- 96-луночные планшеты Millicell-96 с фильтром и резервуаром для изучения транспорта через клеточный монослой 0,4 мкм PCF (Millipore, кат. № PSHT00455, США).
- 96-луночные планшеты 0,5 мл (Agilent, кат. № 5042-1386, США) с силиконовой крышкой (Nalgene, кат. № 276011, США).
- ВЭЖХ-система Acquity UPLC (Waters, США).
- Гибридный масс-спектрометр с тройным квадру-полем и ионизацией электрораспреем QTRAP 4500 (Sciex Corp, США).
- Измеритель сопротивления Millicell-ERS (Millipore, кат. № MERS00001, США).
- CO<sub>2</sub> инкубаторы (Sanyo; Sheldon Mfg. Inc., Япония).
- рН-метр pH410 с электродом ЭСК-10601/7 (Акви-лон, Россия).
- Автоматический счётчик клеток Countess (Invitrogen, США).

### Описание методики проведения анализа с использованием модели Caco-2

Методика эксперимента основывалась на рекомендациях для использования коммерческих наборов MultiScreen® Caco-2 Assay System [6].

Линия клеток Caco-2 была получена из коммерческого набора ATCC (кат. № HTB-37) и культивировалась во флаконах 75 см<sup>2</sup> при 37 °С в среде 5% CO<sub>2</sub> (об/об). Среда культивирования содержала глюкозу (4,5 г/л) с добавлением 10% (об/об) эмбриональной телячьей сыворотки, FBS (HyClone, кат. № SH30070.03), 10 мл незаменимых аминокислот («ПанЭко», кат. № Ф116), 10 мл заменимых аминокислот («ПанЭко», кат. № Ф115/50), 5 мл пирувата натрия («ПанЭко», кат. № Ф023), флакона L-глутамин («ПанЭко», кат. № Ф032) и 5 мл раствора «пенициллин + стрептомицин» («ПанЭко», кат. № А065).

Для проведения эксперимента клетки Caco-2 20–50 пассажа в состоянии 80–90% покрытия флакона рассаживали в планшеты с двухкомпонентными ячейками Millicell 96 в количестве 13000 на 0,11 см<sup>2</sup> лунку (118182 клеток/см<sup>2</sup>). Клетки Caco-2 инкубировали 21 день с периодической сменой среды.

Целостность монослоя проверяли путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с помощью прибора Millicell-ERS. Приемлемым является значение TEER не менее 3 кОм на лунку.

В день эксперимента готовили буферные растворы анализируемого и контрольных веществ – фосфазиды, ранитидина и пропранолола – с концентрацией 1 мкМ и такие же растворы, но с присутствием циклоспорина А с концентрацией 1 мкМ для исследования транспорта соединений в условиях ингибирования эффлюкс-транспорта Pgp.

Для определения скорости транспорта из апикальной (А) в базолатеральную (В) область [А-В] добавляли 90 мкл полученных растворов с анализируемыми веществами в камеру А и по 250 мкл холостого буферного раствора в камеру В.

Для определения скорости транспорта из базолатеральной (В) области в апикальную (А) [В-А] добавляли 250 мкл полученных растворов с анализируемыми веществами в камеру В и по 90 мкл холостого буферного раствора в камеру А.

Таким образом, эксперименты с обоими направлениями транспорта [А-В] и [В-А] проводились параллельно в двух вариантах: обычном и с добавлением циклоспорина А – ингибитора эффлюкс-транспортёра Pgp. Каждый анализ производился в трёх параллельных повторностях с целью дальнейшей статистической обработки данных.

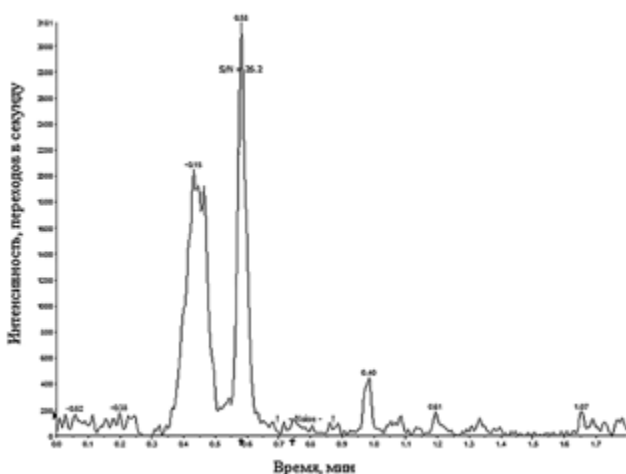
Инкубировали собранную с использованием Millicell 96 систему Caco-2 в течение 2 ч при 37 °С на шейкере с перемешиванием при 300 об/мин. После окончания инкубации разъединяли верхнюю и нижнюю части планшета. Помещали по 210 мкл холодного ацетонитрила в воде (1:1) в подписанные пробирки вместимостью 1,1 мл и по 70 мкл исходных раство-

ров тестируемых и контрольных веществ. В качестве внутреннего стандарта использовали капецитабин в концентрации 1 нг/мл. Перемешивали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа.

### ВЭЖХ-МС/МС-условия

Полученные растворы анализировали на ВЭЖХ-системе Acquity UPLC (Waters, США) с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем QTRAP 4500 (Sciex Corp, США). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst (ver. 1.6.2) (Sciex Corp, США).

- Подвижная фаза: вода Milli-Q (A) / ацетонитрил (B).
- Градиент подвижной фазы: 0–1 мин – 10% B; 1,2–1,3 минуты – от 10% до 90% B; 1,3–2 мин – 90% B.
- Скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин.
- Неподвижная фаза: хроматографическая колонка C18 5 мкм, 150x4,6 мм при температуре  $40^{\circ}\text{C}$ .
- Объем вводимой пробы: 3 мкл.
- Время хроматографирования: 5 мин.
- Детектирование: мониторинг множественных реакций (multiple reactions monitoring, MRM), режим отрицательной ионизации, ион-предшественник  $m/z$  330,08, дочерний ион  $m/z$  125,00, энергия соударений – 45 В.
- Время удерживания фосфазида: около 0,58 мин.



**Рисунок 1.** Хроматограмма на типичном для анализируемых проб из акцепторных отсеков уровне концентраций (наименьший в эксперименте) показывает приемлемый аналитический параметр сигнал/шум  $S/N=26,2$

### Обработка данных

Площади под хроматографическими пиками аналита, нормализованные по сигналу внутреннего стандарта (AUC/IS), считали с помощью программы Analyst (ver. 1.6.2) (Sciex Corp, США) и использовали для расчетов.

Проницаемость ( $P_{app}$ , см/с) через монослой клеток Caco-2 оценивалась по формуле (1).

$$P_{app} = \left( \frac{V_A}{Area * Time} \right) * \left( \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right), \quad (1)$$

где  $V_A$  – объем (мл) в акцепторной лунке, который равен 0,25 для транспорта [A-B] и 0,09 для транспорта [B-A];  $Area$  – площадь поверхности ( $\text{cm}^2$ ), составляет 0,11  $\text{cm}^2$  для 96-луночной плашки MultiScreen Caco-2;  $Time$  – время транспорта (7200 с);  $C_A(t)$  – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента;  $C_D(0)$  – AUC/IS исходного раствора вещества в донорной лунке.

Считают проницаемость ( $P_{app}$ ) вещества в обоих направлениях при наличии и при отсутствии циклоспорина А, а также отношение  $P_{app} \frac{B \rightarrow A}{A \rightarrow B}$ , которое пока-

зывает разницу в проницаемости, возникающую из-за эффлюкс-транспорта. Если отношение  $P_{app} B-A/A-B$  меньше 2,0, то вещество не подвергается активному транспорту и не является субстратом Pgp-транспортера. Для Pgp-субстратов отношение становится близким к 1,0 в присутствии циклоспорина А.

Рассчитанные величины (A)  $\log P$  для ранитидина, пропранолола и фосфазида получали на основании анализа структур их молекул при помощи онлайн-калькулятора ALOGPS 2.1 [7].

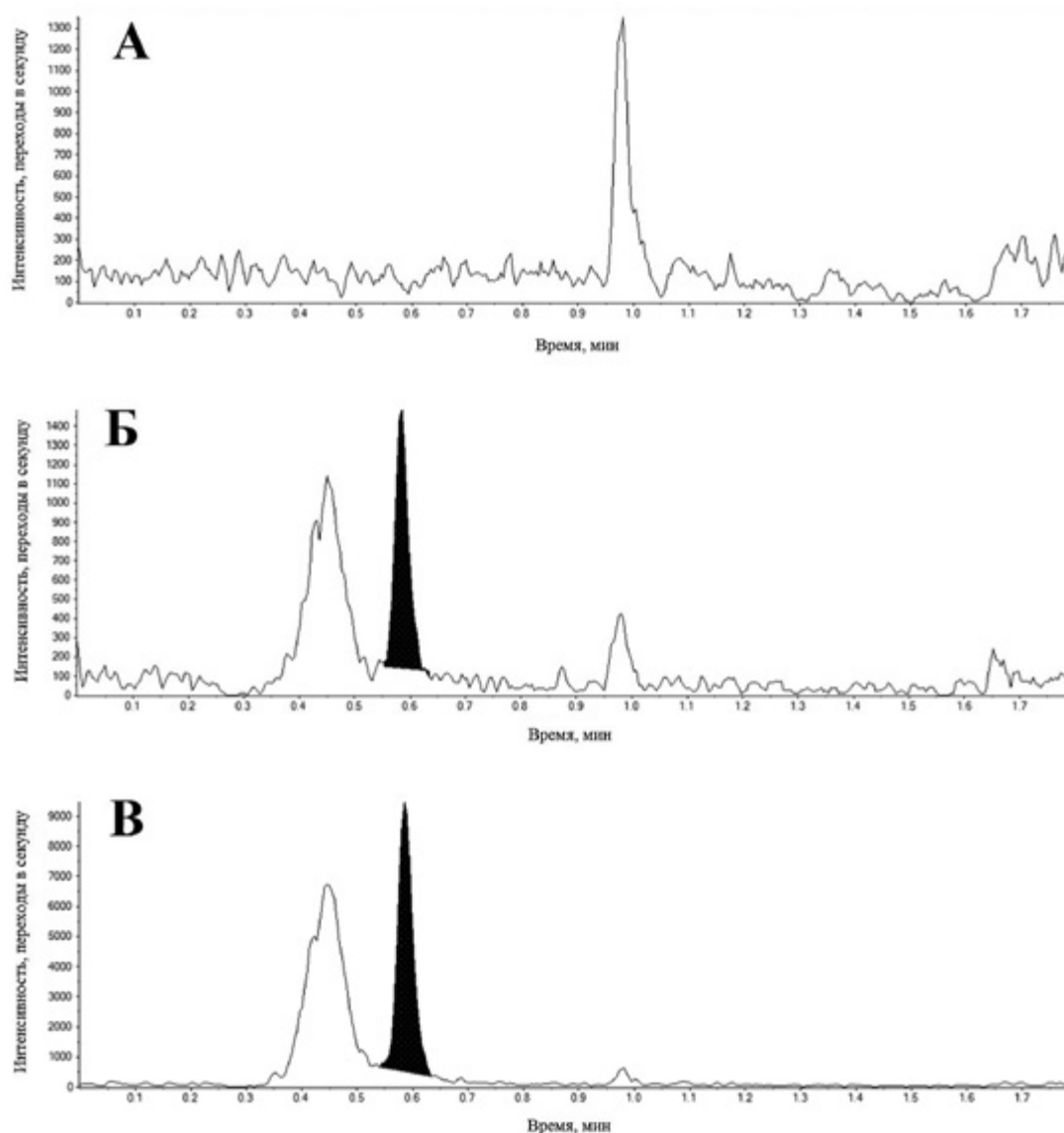
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приводятся результаты эксперимента в четырех вариантах (разное направление транспорта в условиях отсутствия или добавления ингибитора Pgp) с данными по каждой из трёх ячеек для Caco-2. В таблицах 2 и 3 приводятся аналогичные данные для контрольных веществ – ранитидина (низкая проницаемость) и пропранолола (высокая проницаемость).

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости  $P_{app}$  для фосфазида с контрольными веществами можно сделать следующие выводы.

1. Всасываемость фосфазида сопоставима с всасываемостью ранитидина, стандарта низкой кишечной проницаемости ( $P_{app}$  2,0 против 1,4 соответственно).
2. Всасываемость фосфазида значительно ниже всасываемости пропранолола, стандарта высокой кишечной проницаемости ( $P_{app}$  2,0 против 22,1 соответственно).

Таким образом, фосфазид может быть классифицирован как субстанция с низкой всасываемостью по классификации БКС.



**Рисунок 2.** Примеры хроматограмм фосфазид: А) холостого раствора, Б) раствора из акцепторного отсека, В) раствора из донорного отсека

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости  $P_{app}$  для фосфазид в разных направлениях транспорта при отсутствии и при наличии ингибитора эффлюкс-транспортёра  $P_{gp}$  можно сделать следующие выводы.

1. Фосфазид, как показано в эксперименте [B-A], является субстратом эффлюкс-транспортёра  $P_{gp}$  и активно выводится из клетки в нормальных условиях, в то время как в присутствии ингибитора этого транспортёра интенсивность транспорта заметно снижается ( $P_{app}$  5,7 против 0,6 соответственно).
2. Фосфазид также может быть охарактеризован как субстрат эффлюкс-транспортёра  $P_{gp}$  на основании расчёта отношения  $P_{app} \frac{B \rightarrow A}{A \rightarrow B}$ , которое составило 2,85 (отношение должно быть больше 2).

3. При обнаруженном в эксперименте уровне погрешности не представляется возможным сравнить интенсивность транспорта [A-B] при отсутствии и при наличии ингибитора  $P_{gp}$ .

Полученные показатели кажущейся кишечной проницаемости  $P_{app}$  исследуемого и контрольных веществ были сопоставлены с соответствующими величинами (А)  $\log P$  (таблица 4). На основании этого сопоставления можно сделать вывод, что, хотя между величинами и наблюдается значимая корреляция ( $r^2=0,853$ ), позволяющая достоверно разделить вещества с высокой и низкой кишечной проницаемостью, погрешность эксперимента всё же не даёт возможности обоснованно сравнить сопоставимые по всасываемости вещества, что видно из примера с фосфазидом и рантидином (RSD составляет 46,8% и 15,7% соответственно). Предположительно, для более точных данных эксперимент с Caco-2 должен быть повто-

рён с использованием растворов более высоких концентраций при условии доказательства сохранения нормальной жизнедеятельности клеток монослоя в данных условиях. Тем не менее погрешность эксперимента не мешает сделать обоснованное предположение о фосфазида как о веществе с низкой всасываемостью по БКС.

Таблица 1.

Кажущаяся кишечная проницаемость  $P_{app}$  фосфазида в модели Caco-2

Номер ячейки	Фосфазид			
	$P_{app}$ , $\times 10^{-6}$ см/с			
	[A-B]	[B-A]	[A-B] + ингибитор Pgp	[B-A] + ингибитор Pgp
1	3,0	7,5	5,5	0,8
2	1,1	8,7	0,8	0,6
3	2,0	0,9	1,9	0,4
Среднее	2,0	5,7	2,8	0,6
SD	0,9	4,2	2,5	0,2
RSD, %	46,8	73,6	88,7	37,9

Таблица 2.

Кажущаяся кишечная проницаемость  $P_{app}$  ранитидина в модели Caco-2

Номер ячейки	Ранитидин	
	$P_{app}$ A-B, $\times 10^{-6}$ см/с	
1	1,5	
2	13,1*	
3	1,2	
Среднее	1,4	
SD	0,2	
RSD, %	15,7	

Примечание: \*данные исключены из расчётов.

Таблица 3.

Кажущаяся кишечная проницаемость  $P_{app}$  пропранолола в модели Caco-2

Номер ячейки	Пропранолол	
	$P_{app}$ A-B, $\times 10^{-6}$ см/с	
1	22,8	
2	23,6	
3	20,0	
Среднее	22,1	
SD	1,9	
RSD, %	8,4	

Таблица 4.

Корреляция кажущейся кишечной проницаемости  $P_{app}$  и (A) LogP

Вещество	$P_{app}$ , $\times 10^{-6}$ см/с	(A) LogP
Фосфазид	2,0	0,68
Ранитидин	1,4	0,79
Пропранолол	22,1	3,03
$r^2$	0,853	

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследования кишечной проницаемости фосфазида *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 можно предварительно охарактеризовать фосфазид как субстанцию с низкой всасываемостью по классификации БКС, что соответствует имеющимся литературным данным. Коэффициент кажущейся кишечной проницаемости  $P_{app}$  для фосфазида сопоставим с таковым для вещества-стандарта низкой кишечной проницаемости ранитидина и значительно уступает веществу-стандарту высокой кишечной проницаемости пропранололу. Результат согласуется с прогнозируемой на основании расчётных показателей липофильности (A) LogP кишечной проницаемостью молекул. Результаты исследования также позволяют сделать предположение о родстве фосфазида к эффлюкс-транспортёрам Pgp. Сделанные выводы позволяют продолжить более подробное изучение свойств фосфазида в условиях *in vivo* путем проведения соответствующих клинических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. P. Artursson, K. Palm, K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport // Advanced drug delivery reviews. 2001. Т. 46. № 1. С. 27–43.
2. Draft guidance for industry, waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system / FDA. 2015.
3. Н.В. Сизова и др. Фосфазид – отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции. Второе рождение // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4. № 2. С. 45–54.
4. А.Ф. Хохлов, Б.В. Бровченко, А.А. Смирнов. Разработка и регистрация комбинированного лекарственного препарата для лечения ВИЧ-инфекции на основе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ)-фосфазида и ламивудина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1. С. 48–60.
5. И.Е. Шохин и др. Изучение кинетики растворения инновационного антиретровирусного препарата Никавир® и его фиксированной комбинации с ламивудином (Фосфаладин®) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2. С. 136–145.
6. J. Phillips, A. Arena. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies / Millipore Corporation Protocol Note PC1060EN00. 2003.
7. Интерактивные расчеты. URL: <http://www.vclab.org/web/alogps> (дата обращения 08.2017).