

The utility of *in vitro* trials that use Caco-2 cell systems as a replacement for animal intestinal permeability and human bioequivalence measurements in drug development

A utilidade de ensaios in vitro com culturas celulares - Caco-2 - como substitutos da determinação da permeabilidade intestinal no animal e da bioequivalência no humano no desenvolvimento de novos fármacos

Margarida Estudante^{1,2}, Cristina de Mello-Sampayo¹, Selma Sahin^{2,3}, José Morais¹ and Leslie Z. Benet²

¹Pharmacological Sciences Department, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

²Department of Biopharmaceutical Sciences, University of California, San Francisco

³Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100-Ankara, Turkey

Email: mestudante@ff.ul.pt

Abstract

Caco-2 cells have been widely used for *in vitro* intestinal permeability screening of new molecules in drug development but with some pitfalls. Limiting the application of Caco-2 permeability screening to passive compounds is difficult as the majority of approved drugs include both passive diffusion and active transport. The aim of this study was to evaluate Caco-2 cells utility in assessing effects of P-gp mediated efflux. For that purpose the study design included the highly soluble, highly permeable (class 1), verapamil and diltiazem, the highly soluble and poorly permeable drug (class 3) digoxin and the P-gp inhibitor GG918. The apparent permeability and efflux ratio (ER) were calculated. Digoxin, a positive control for P-gp, presented an ER of 4, which decreased to around 1 by GG918 addition, consistent with a P-gp effect in Caco-2 cells. ER for verapamil and diltiazem was nearly 1 and the presence of GG918 resulted in no ERs changes. These results suggest that P-gp apparently plays a minimal role in transport of class 1 drugs across Caco-2 cells while class 3 drugs should be significantly affected by P-gp. It is suggested that Caco-2 cells may be useful to determine whether P-gp plays a relevant role in intestinal absorption.

Key words: Caco-2, intestinal permeability, P-glycoprotein, diltiazem, verapamil, digoxin.

Resumo

As células Caco-2 são amplamente utilizadas no rastreio da permeabilidade intestinal de novas moléculas, embora com algumas limitações. A utilização de Caco-2 apenas para compostos com permeabilidade passiva elevada é difícil, uma vez que a maioria dos medicamentos aprovados incluem difusão passiva e transporte ativo. Este trabalho avalia a utilidade das células Caco-2 para previsão dos efeitos de efluxo mediados pela P-gp. O protocolo experimental incluiu fármacos altamente solúveis e permeáveis (classe 1), verapamilo e diltiazem, um fármaco altamente solúvel e pouco permeável (classe 3), digoxina e um inibidor da P-gp, GG918. Calcularam-se as permeabilidades aparentes e as razões de efluxo (ER). A digoxina, controlo positivo para a P-gp, apresentou uma ER de 4, que diminuiu para aproximadamente 1 por adição de GG918, consistente com um efeito da P-gp nestas células. As ER para o verapamilo/ diltiazem situaram-se próximo da unidade na ausência e presença de GG918. Estes resultados sugerem que a P-gp poderá desempenhar um papel irrelevante no transporte de fármacos de classe 1 em células Caco-2, enquanto o transporte de fármacos de classe 3 poderá ser significativamente afectado pela P-gp. É proposto que as células Caco-2 podem ser úteis para determinar o papel da P-gp na absorção intestinal. a

Palavras-Chave: Permeabilidade intestinal, Caco-2, glicoproteína-P, diltiazem, verapamilo, digoxina.

Received / *Recebido*: 31/03/2015

Accepted / *Aceite*: 28/04/2015

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>

Introduction

Patient/population preferences for oral formulations drive industry wide predilection for drugs that can be intestinally absorbed. The ability of a new molecular entity (NME) to cross biological membranes, especially the intestinal mucosa, is crucial in selecting a viable drug candidate in the drug discovery process. The oral absorption of a drug is fundamentally dependent on drug's aqueous solubility and gastrointestinal permeability. Extensive research into these fundamental parameters by Amidon *et al*^[1] led to the Biopharmaceutics Classification System (BCS) that categorizes drugs into four classes (1 to 4) based on the critical components related to oral absorption. Centrally embracing permeability and solubility, the objective of the BCS is to allow prediction of *in vivo* absorption performance of drug products from *in vitro* measurements of permeability and solubility.

In 2000, the FDA promulgated the BCS as a science based approach to allow waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence testing for immediate release solid dosage forms for class 1 compounds, highly soluble and highly permeable drugs, when such drug products also exhibit rapid dissolution^[2]. In 2010, EMA issued the Guideline on Investigation of Bioequivalence^[3] where BCS biowaivers were clearly defined, as opposed to the ambiguous definitions in the previous Note for Guidance^[4]. One of the main advancements of the EU guideline is the acceptance of biowaivers not only for class 1 drugs, but for class 3 drugs (highly soluble and poorly permeable drugs) as well, under strict conditions^[4]. The BCS based biowaiver approach is meant to reduce *in vivo* bioequivalence studies, i.e., it may represent a surrogate for *in vivo*, time-consuming and expensive bioequivalence studies^[1].

Another important concern during drug development is the potential for drug-drug interactions (DDI). DDI can cause profound clinical effects, either by reducing or enhancing toxicity or therapeutic efficacy of drugs^[5]. In both the EU and USA, the first DDI guidance was published in 1997 and the most recent guidance versions were issued in 2012 (FDA) and 2013 (EMA). In both guidelines an increased emphasis has been given on transporter based DDI evaluations, including the requirement that all NME have to be investigated as substrates for the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp)^[5].

When the BCS was proposed, there was limited information on the relevance of drug transporters on oral absorption. The recognition of BCS classes elimination pathway differences, combined with the inherent difficulty in quantifying the percent of drug absorbed in

Introdução

A preferência dos doentes/população para formulações orais constitui uma forte motivação para a pesquisa de moléculas que possam ser absorvidas a nível intestinal. A capacidade de uma nova entidade molecular (NME) para atravessar membranas biológicas, especialmente a mucosa intestinal, é crucial na pesquisa e desenvolvimento de candidatos a fármaco viáveis. A absorção oral de um fármaco é fundamentalmente dependente da solubilidade da molécula em meio aquoso e da sua permeabilidade gastrointestinal. Amidon *et al*^[1], após extensa investigação sobre esses parâmetros fundamentais, propôs o Sistema de Classificação Biogalénica (BCS) que categoriza as moléculas em quatro classes (1 a 4) com base nos componentes críticos relacionados à absorção oral. Centralmente focado na permeabilidade e solubilidade, o objetivo do BCS é permitir a predição do desempenho de absorção *in vivo* de fármacos com base em medições *in vitro* da permeabilidade e solubilidade.

Em 2000, a FDA promulgou a BCS como uma abordagem de base científica para permitir a dispensa de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência *in vivo* (*biowaivers*) para formas farmacêuticas de libertação imediata de compostos pertencentes à classe 1, fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis, quando tais compostos apresentem igualmente dissolução rápida^[2]. Em 2010, a EMA emitiu a *Guideline on Investigation of Bioequivalence*^[3] onde claramente define *biowaivers* em oposição à definição ambígua na anterior Norma Orientadora^[4]. Um dos principais avanços da diretiva Europeia é a aceitação de *biowaivers* não só para fármacos de classe 1, mas igualmente para fármacos de classe 3 (altamente solúveis e pouco permeáveis) sob condições estritas^[4]. O conceito de *biowaiver* baseado na abordagem BCS destina-se a reduzir o número de estudos de bioequivalência *in vivo*, ou seja, a substituir estudos de bioequivalência *in vivo*, por norma demorados e dispendiosos^[1].

Outra preocupação importante durante o desenvolvimento de novos fármacos é o potencial para interações medicamentosas (DDI). As DDI podem causar profundos efeitos clínicos, ao reduzir ou aumentar a toxicidade ou eficácia terapêutica dos fármacos^[5]. Quer a União Europeia (EMA) quer os Estados Unidos (FDA) publicaram a primeira Norma Orientadora sobre DDI em 1997 e versões atualizadas foram publicadas em 2012 (FDA) e 2013 (EMA). Em ambos os documentos foi dado um ênfase crescente às DDI mediadas por transportadores, incluindo a exigência de que todas as NME tenham que ser investigadas como substratos para o transportador de efluxo glicoproteína-P (P-gp)^[5].

Quando a BCS foi proposta havia pouca informação sobre a importância dos transportadores de fármacos na absorção oral. As diferenças nas vias de eliminação

humans at a level of 90 %, prompted Wu and Benet^[6] to suggest the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) where the permeability criteria was replaced by route of elimination. BDDCS is also postulated to be useful as the basis for predicting overall drug disposition, including the effects of efflux and absorptive transporters on oral drug-absorption.

Research focused on elucidating the influence of transporters on drug disposition has been ongoing for many years^[7]. Various *in vitro* technologies exist to investigate transporters, examples being the well-characterized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line and the industry standard human colonic adenocarcinoma (Caco-2) cell line. Cellular assays assessing the bidirectional transport of compounds across a cell monolayer is a widely accepted approach that accounts for passive and active components of absorption. Although in Caco-2 cell model transporter effects may emerge from endogenously expressed proteins^[8], it has been suggested to limit the application of Caco-2 permeability screening to passive compounds. However, the majority of drugs on the market include both passive diffusion and active transport^[9]. In this study, we focus on the Caco-2 endogenous cell system and evaluate its utility and adequacy in assessing the P-gp mediated efflux. As the Caco-2 cells are derived from the human gastrointestinal (GI) tract as opposed to the MDCK cells, we believe the assays conducted in the Caco-2 cell system will more closely simulate *in vivo* drug behavior. To evaluate the utility of Caco-2 cells, the study designed includes the class 1 drugs, verapamil and diltiazem, and the class 3 drug digoxin, in control conditions and with an inhibitor of intestine efflux transporters like P-gp. In addition, transport of these drugs in the presence of GG918 P-gp inhibitor has not yet been investigated.

por classe BCS, bem como a inerente dificuldade em quantificar a percentagem de fármaco absorvido em seres humanos a um nível de 90 %, levou Wu e Benet^[6] a sugerir um novo Sistema de Classificação Biogalénica, *The Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System* (BDDCS), onde o critério de permeabilidade foi substituído por via de eliminação. A BDDCS revela-se ainda útil como base para uma previsão das vias de eliminação dos fármacos, incluindo os efeitos dos transportadores de efluxo e captação na biodisponibilidade oral.

O estudo da influência dos transportadores de fármacos na sua absorção, distribuição e eliminação tem vindo cada vez mais a ser objecto de pesquisa^[7]. Existem várias tecnologias *in vitro* para investigar o papel dos transportadores, sendo exemplo disso as bem caracterizadas células de rim canino Madin-Darby (MDCK) e a linha celular de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), usada como referência pela indústria farmacêutica. Os ensaios que avaliam o transporte bidirecional de compostos através de uma monocamada de células são uma abordagem amplamente aceite, que tem em conta as componentes de transporte passivo e ativo no processo global de absorção. Embora nas células Caco-2 os efeitos dos transportadores possam surgir devido a proteínas expressas endogenamente^[8] tem sido sugerido limitar o rastreio da permeabilidade em Caco-2 a compostos com absorção maioritária por difusão passiva. No entanto, a generalidade dos fármacos no mercado incluem componentes tanto de difusão passiva como de transporte ativo^[9]. Neste estudo focamos no sistema celular endógeno das células Caco-2 e avaliamos a sua utilidade na avaliação do efluxo mediado pela P-gp. Como as células Caco-2 são derivadas do trato gastrointestinal (GI) humano, em oposição às células MDCK, acreditamos que os ensaios realizados no sistema de células Caco-2 irá simular de forma mais adequada o comportamento *in vivo* de fármacos. Para avaliar a utilidade das células Caco-2, o estudo inclui os fármacos de classe 1, verapamil e diltiazem e o fármaco de classe 3 digoxina, em condições controlo e com um inibidor de transportadores de efluxo no intestino, como a P-gp. Adicionalmente, o transporte destes fármacos na presença do inibidor da P-gp GG918 ainda não foi investigado.

Materials and Methods

Materials

[³H]-Digoxin was purchased from Moravek Biochemicals and Radiochemicals (Brea, CA), [³H]-diltiazem and [N-methyl-³H]-Verapamil hydrochloride from Perkin Elmer (Waltham, MA). GG918 (GF120918) was a kind

Materiais e Métodos

Materiais

[³H]-digoxina foi comprado à empresa Moravek Biochemicals and Radiochemicals (Brea, CA), [³H]-diltiazem e o [N-metil-³H]-cloridrato de verapamil à Perkin Elmer (Waltham, MA). GG918 (GF120918) foi gentil-

gift from GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, NC). All other chemicals were of reagent grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Cell cultures

Caco-2 cells (ATCC - Manassas, VA), cultured in six-well treated polystyrene plates (Corning Life Science, MA) containing minimum essential medium (MEM, Eagle's) with Earle's balanced salt solution (BSS) supplemented with 15 % FBS, 0.1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, were seeded (60,000 cells/cm²) according to previously described protocols [10]. Caco-2 cells grown as epithelial monolayers on polycarbonate membrane inserts (pore size 0.4 µm, diameter 4.2 cm², BD Biosciences) were used for transport experiments 21 days after seeding.

Bidirectional Transport Experiments

The transport assays were performed following a modified protocol previously described [11]. In brief, cell monolayers were preincubated in control transport buffer (Hank's buffered salt solution containing 25 mM HEPES and 1 % FBS, pH 7.4) at 37 °C for 20 minutes and the transepithelial electrical resistance (TEER) measured for assessment of monolayer integrity (Millicell system using "chopstick" electrodes, Millipore Corporation). Caco-2 cells system possessed TEER of approximately 800-1000 Ω·cm². Cells were incubated at 37 °C with shaking (25 strokes/minute) with drug solutions of tritiated diltiazem, verapamil or digoxin (10 nM and 10 µM) in the apical or basolateral compartments with or without P-gp inhibitor GG918 (0.5 µM). At 1, 2, and 3 hours, 200 µL-samples from the apical or basolateral side were taken, after which the cells monolayers were solubilized in an ultrasonic bath. All samples were mixed with 5 mL Econo-Safe™ Counting Cocktail (Mount Prospect, IL) and radioactivity associated with the samples and cells determined by liquid scintillation counting (Beckman LS180). The apparent permeability (Papp) values were calculated as the product of permeability rate, initial donor concentration and filter surface area ($P_{app} = \text{Rate of transport}/(\text{surface area} \times \text{initial donor concentration})$) where the rate of transport was measured from the flux of drug across the cells. The ratio of basolateral-to-apical (B to A) over apical-to-basolateral (A to B) transport was taken as a measure of net secretion (efflux ratio, ER). All experiments were performed in triplicate and conducted on at least three separate occasions to ensure reproducibility. The statistical treatment of the data was performed us-

mente cedido pela GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, NC). Todos os outros produtos químicos usados foram de grau analítico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Culturas de células

As células Caco-2 (ATCC - Manassas, VA) foram cultivadas em placas de seis poços de poliestireno tratadas (Corning Life Sciences, MA), contendo meio essencial mínimo (MEM Eagle's) com solução de sais equilibrada (BSS) Earle's suplementado com 15 % FBS, 0.1 mM piruvato de sódio, 0.1 mM aminoácidos não-essenciais, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina, de acordo com protocolos anteriormente descritos (60.000 células/cm²) [10]. As células Caco-2 cresceram em monocamadas epiteliais em suportes de polycarbonato (dimensão dos poros 0,4 µm, diâmetro 4,2 cm², BD Biosciences) e utilizadas para ensaios de transporte após 21 dias de cultura.

Ensaio de transporte bidirecional

Os estudos de transporte foram realizados de acordo com protocolos descritos [11]. Resumidamente, as monocamadas de células foram pré-incubadas em solução de transporte tamponada (solução salina Hank contendo 25 mM HEPES e 1 % FBS, pH 7,4) a 37 °C durante 20 minutos e foi medida a resistência elétrica transepithelial (TEER) para avaliação da integridade da monocamada (sistema de eléctrodos Millicell, Millipore Corporation). Os valores de TEER medidos situaram-se aproximadamente entre 800 a 1000 Ω·cm². Posteriormente as células foram incubadas a 37 °C em agitador orbital (25 rpm/minuto), com soluções de fármaco tritiado (diltiazem, verapamil ou digoxina; 10 nM e 10 µM), adicionadas aos compartimentos apical ou basolateral, com ou sem inibidor da P-gp GG918 (0,5 µM). Após 1, 2 e 3 h foram recolhidos 200 µL de amostra do lado apical ou basolateral e no final da experiência, as monocamadas de células foram solubilizadas em banho de ultrassons. Todas as amostras foram misturadas com 5ml de Econo-Safe™ Cocktail (Mount Prospect, IL) e a radioatividade associada com as amostras/ células foi determinada num contador de cintilações (Beckman LS180). Os valores de permeabilidade aparente (Papp) foram calculados como o produto da velocidade de transporte, concentração inicial do local dador e área de superfície do filtro ($P_{app} = \text{velocidade de transporte} / (\text{área de superfície} \times \text{concentração inicial do local dador})$), sendo a velocidade de transporte medida como o fluxo de fármaco através das células. A razão entre o transporte do lado basolateral para o apical (B para A) e o transporte do lado apical para o basolateral (A para B) é uma medida da secreção do fármaco (razão de efluxo, ER). Todos as experiências foram realizadas em triplicado, em pelo menos três ocasiões diferentes, para garantir a reprodutibilidade. O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o teste *t-student*

ing t-student test (GraphPad Prism 5.0) and differences considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

BDDCS class 1 Bidirectional transport studies in Caco-2 cells

Transport profiles of 10 nM and 10 μ M verapamil and of 10 nM and 10 μ M diltiazem across Caco-2 cells in control and P-gp inhibitory conditions are depicted in Figure 1 and 2, respectively and revealed overlapping transport curves for each drug. The calculated apparent permeability (Papp) values for verapamil in the Caco-2 cells were nearly the same in both apical to basolateral (A to B) and basolateral to apical (B to A) directions, at both tested concentrations. The measurement of both directions Papp allowed computation of the net efflux ratio (ER) (Papp B to A / Papp A to B) (Table 1). For both tested concentrations of verapamil, the ER in control transport buffer was nearly 1 as observed by the insignificant difference in B to A and A to B transport. Similar results were observed for tested concentrations of 10 μ M diltiazem. For 10 nM diltiazem, a higher basolateral to apical apparent permeability was measured but the efflux ratio was close to 1. The presence of the P-gp

(GraphPad Prism 5.0) e as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Estudos de transporte bidirecional de fármacos BDDCS classe 1 em células Caco-2

Os perfis de transporte através de células Caco-2, sem (controlo) e com inibição da P-gp, para o verapamil e para o diltiazem (10 nM e 10 μ M) encontram-se representados nas Figuras 1 e 2, respectivamente e revelaram sobreposição das curvas para ambos os fármacos. Os valores calculados de permeabilidade aparente (Papp) para o verapamil nas células Caco-2 são praticamente idênticos em ambos os sentidos: apical para basolateral (A para B) e basolateral para apical (B para A), nas duas concentrações testadas. Estes valores de Papp permitem calcular a razão de efluxo (ER) (Papp B para A / Papp A para B) (Tabela 1). Para ambas as concentrações testadas de verapamil a ER em situações de controlo situa-se próxima da unidade, como se constata pela diferença insignificante da Papp de B para A e de A para de B. Foram observados resultados semelhantes para a concentração de 10 μ M de diltiazem. Para a concentração de 10 nM de diltiazem registou-se uma maior Papp do lado basolateral para o apical, mas a razão de efluxo

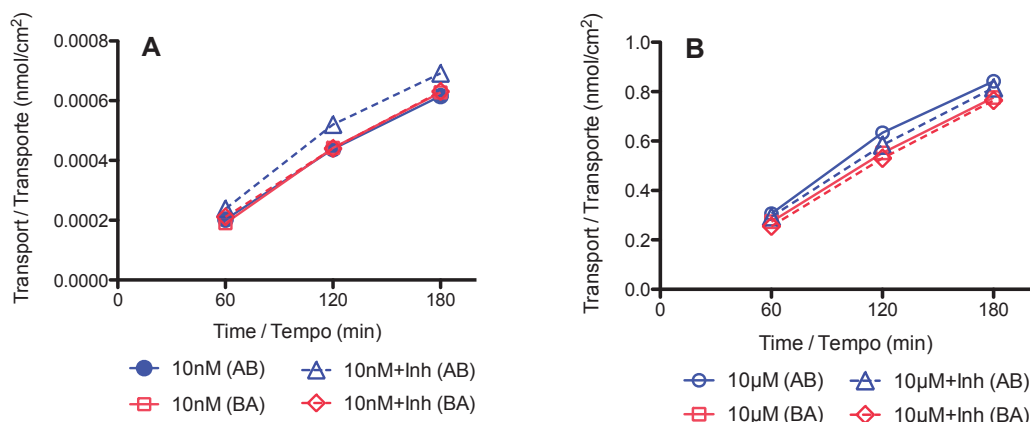


Figure 1/ Figura 1. Bidirectional transport of 10 nM (A) and 10 μ M (B) verapamil in Caco-2 cells in the presence or absence of known P-gp inhibitor, GG918 (0.5 μ M).

Transporte bidirecional de 10 nM (A) e 10 μ M (B) de verapamil em células Caco-2 na presença ou ausência do conhecido inibidor da P-gp, GG918 (0,5 μ M).

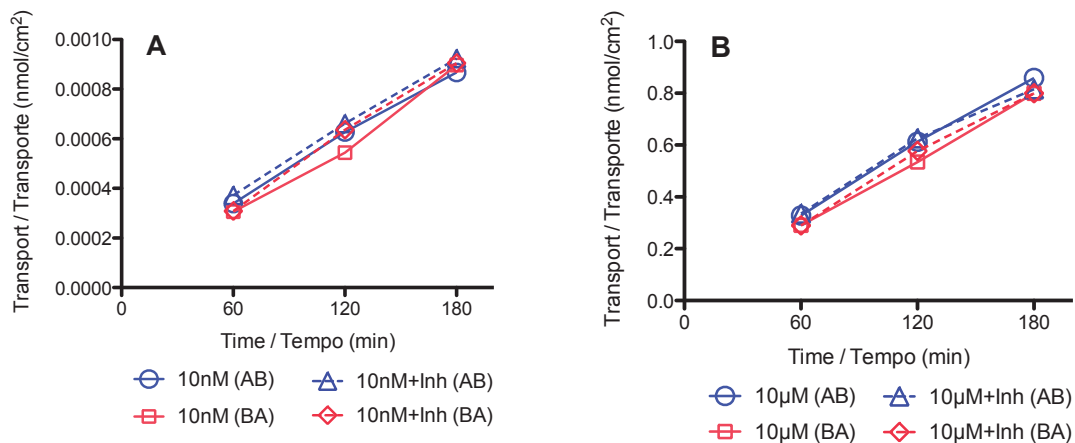


Figure 2/ Figura 2. Bidirectional transport of 10 nM (A) and 10 μ M (B) diltiazem in Caco-2 cells in the presence or absence of known P-gp inhibitor, GG918 (0.5 μ M).

Transporte bidirecional de 10 nM (A) e 10 μ M (B) de diltiazem em células Caco-2 na presença ou ausência do conhecido inibidor da P-gp, GG918 (0,5 μ M).

inhibitor GG918 (0.5 μ M) resulted in no change in net flux ratios of both verapamil and diltiazem in all tested concentrations (Table 1).

BDDCS class 3 Bidirectional transport studies in Caco-2 cells

Figure 3 illustrate the transport profiles of the tested class 3 drug, digoxin, across Caco-2 cells in control and P-gp inhibitory conditions. The net flux ratio (B to A / A to B) in control transport buffer was 4.5 for digoxin 10 nM and 10 μ M. With the addition of P-gp inhibitor (GG918, 0.5 μ M), basolateral to apical transport de-

mantem-se perto da unidade. A presença de inibidor da P-gp, GG918 (0,5 μ M), não induziu qualquer alteração nas ERs dos fármacos estudados, verapamilo e diltiazem, nas concentrações testadas (Tabela 1).

Estudos de transporte bidirecional de fármacos BDDCS classe 3 em células Caco-2

A Figura 3 ilustra o perfil de transporte do fármaco de classe 3 testado, digoxina, através das células Caco-2 sem (controlo) e com inibição da P-gp. A razão de efluxo (ER) (B para A / A para B) na situação controlo foi de 4.05 para a digoxina 10 nM e 10 μ M. Com a adi-

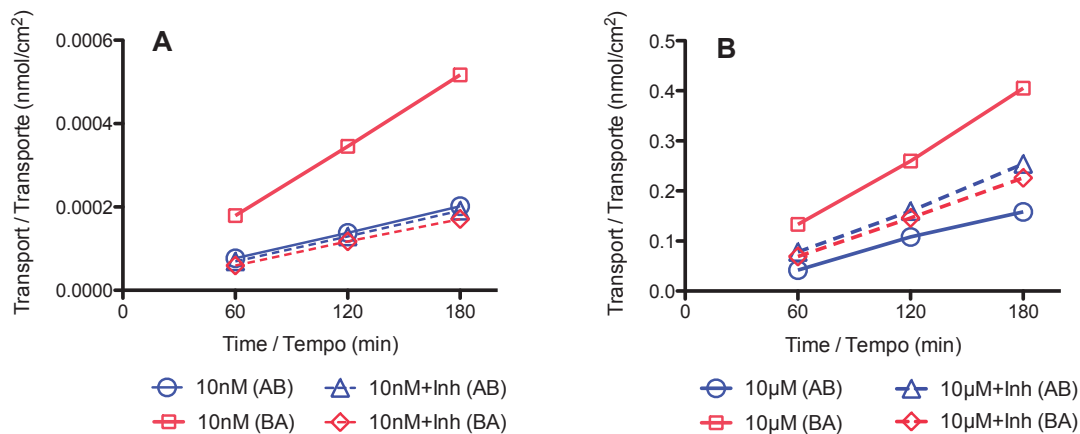


Figure 3/ Figura 3. Bidirectional transport of 10 nM (A) and 10 μ M (B) digoxin in Caco-2 cells in the presence or absence of known P-gp inhibitor, GG918 (0.5 μ M).

Transporte bidirecional de 10 nM (A) e 10 μ M (B) de digoxina em células Caco-2 na presença ou ausência do conhecido inibidor da P-gp, GG918 (0,5 μ M).

Table 1/ Tabela 1. In vitro apparent permeability (P_{app} , $\text{nm}\cdot\text{sec}^{-1}$), using the Caco-2 cell system with and without inhibition (control) of P-gp mediated efflux transport (0.5 μM GG918). ER (Papp B to A/ Papp A to B, efflux ratio); *i* indicates the presence of GG918, * $p < 0.05$ vs control.

Permeabilidade aparente (P_{app} , $\text{nm}\cdot\text{sec}^{-1}$) *in vitro*, usando o sistema de células Caco-2, com e sem inibição (controle) do transportador de efluxo P-gp (0,5 μM GG918). ER (Papp B to A/ Papp A to B, razão de efluxo); *i* indica a presença de GG918; * $p < 0,05$ vs controle.

Drug/ Fármaco	P_{app} (A→B)	P_{app} (B→A)	ER	P_{app}^i (A→B)	P_{app}^i (B→A)	ER ⁱ
Verapamil						
10 nM	65.2 ± 2.9	71.2 ± 3.6	1.09	72.4 ± 4.7	73.1 ± 2.0	1.01
10 μM	93.3 ± 4.1	84.5 ± 2.9	0.90	91.3 ± 1.2	82.9 ± 2.2	0.91
Diltiazem						
10 nM	59.4 ± 5.6	98.6 ± 4.3	1.66	68.0 ± 6.0	105.4 ± 2.5	1.55
10 μM	72.8 ± 2.4	64.4 ± 3.6	0.88	68.6 ± 3.8	63.8 ± 1.9	0.93
Digoxin/ Digoxina						
10 nM	14.7 ± 2.2	59.7 ± 3.1	4.05	20.9* ± 0.6	29.3* ± 2.1	1.40
10 μM	13.5 ± 3.1	54.7 ± 2.1	4.05	21.8* ± 2.4	30.6* ± 1.3	1.40

creased while apical to basolateral increased. The presence of GG918 resulted in a reduction of the net flux ratio to 1.4 for digoxin, a decrease of 68 % (Table 1).

ção do inibidor da P-gp (GG918, 0.5 μM), o transporte basolateral para apical diminuiu enquanto o transporte apical para basolateral aumentou. A presença de GG918 resultou numa redução do ER da digoxina para 1.4, uma diminuição de 68 % (Tabela 1).

Discussion

Comprehensive data resulting from years of *in vitro* cellular assays and *in vivo* animal studies has led to our presumption that almost all drugs are substrates for some transporter. However, this is not to say that transporter effects will always be clinically relevant. In other words, an *in vitro* net flux ratio (B to A / A to B) of 4 for a given drug, which according to the Food and Drug Administration (FDA) is indicative of a transporter substrate [12], may translate *in vivo* to a negligible contribution of the transporter to that same drug's disposition. In this study, we selected the anti-hypertensive drugs

Discussão

Uma revisão aprofundada dos dados de ensaios celulares *in vitro* e estudos *in vivo* de animais obtidos ao longo dos anos, leva-nos a sugerir que quase todos os fármacos são substratos para algum tipo de transportador. No entanto, isto não é sinónimo de que os efeitos dos transportadores venham a ser sempre clinicamente relevantes. Por outras palavras, uma razão de efluxo *in vitro* (B para A / A para B) de 4 para um determinado fármaco, que de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) é indicativo dessa molécula ser substrato para determinado transportador [12], pode acabar por traduzir-se *em vivo* por uma contribuição negligenciável

verapamil and diltiazem as BCS/ BDDCS class 1 compounds. Both drugs are highly permeable and extensively metabolized by the CYP3A4 enzyme. Moreover, both are known substrates of the efflux transporter, P-gp. In fact, verapamil is considered to be a model P-gp substrate and probe^[2]. We also selected digoxin as a positive control for P-gp activity in Caco-2 cells, as it is a well-known P-gp substrate^[12].

We performed several bidirectional transport studies with each drug in the Caco-2 cell systems. In order to test the utility of Caco-2 cells to assess the effect of efflux transporters, studies were conducted in the presence or absence of the known P-gp inhibitor, GG918. In general, a compound is considered a P-gp substrate if it exhibits a net flux ratio *in vitro* of 2-3 or greater^[12]. As stated earlier, verapamil, diltiazem and digoxin are known P-gp substrates. Our data from Caco-2 cells, however, did not confirm that both anti-hypertensive drugs are P-gp substrates by definition. The bidirectional transport of the class 1 verapamil and diltiazem resulted in overlapping B to A and A to B profiles and net flux ratios close to 1, which indicate passive permeability as the driving force. Their Papp values were unaffected by addition of the P-gp inhibitor and the net flux ratio remained unchanged, suggesting no influence of P-gp. Results obtained in Caco-2 cells with a different P-gp inhibitor (LY335979) further confirm the lack of P-gp effect for class 1 drugs in the intestine^[13]. These results indicate that both verapamil and diltiazem absorption is controlled by its passive diffusion and not P-gp. Only the class 3 digoxin results were indicative of a P-gp substrate with transport in the B to A direction greater than A to B direction and net flux ratio of 4.05. The digoxin revealed P-gp effect which also validated our Caco-2 model regarding P-gp function and inhibition. It follows that digoxin transport, and not verapamil or diltiazem transport, was affected by addition of GG918, which resulted in returning the net efflux ratio to 1.

The question remains, however - what cell line is the appropriate model system for determining these net efflux ratios? Experimentation with verapamil, diltiazem and digoxin suggests that the Caco-2 cell system may be an appropriate model system to determine whether a P-gp effect may play a significant role in absorption. However, a transporter effect observed in the Caco-2 cell system may not necessarily be observed in another cell system^[10]. The lower TEER values of the Caco-2 cells makes for a leakier system that we believe is far more representative of the human intestine. Verapamil, as well as drugs like midazolam and diazepam, are often used as model substrate^{[2][12]}. However, all are class 1 compounds, thereby bringing that methodology into

do transportador para a farmacocinética desse mesmo fármaco.

Neste estudo selecionámos os fármacos anti-hipertensores verapamil e diltiazem como compostos BCS / BDDCS de classe 1. Ambos os fármacos são altamente permeáveis e extensivamente metabolizados pela enzima CYP3A4. Além disso, ambos são descritos como substratos do transportador de efluxo, P-gp. Na verdade, o verapamil é considerado como um substrato modelo e sonda para a P-gp^[2]. Também selecionámos a digoxina como um controlo positivo para atividade de P-gp em células Caco-2, uma vez que é um substrato conhecido deste transportador^[12].

Realizámos estudos de transporte bidirecional com vários fármacos nos sistemas de células Caco-2. De modo a testar a utilidade destas células na validação do efeito dos transportadores de efluxo, estes foram conduzidos na presença ou ausência do conhecido inibidor da P-gp, GG918. Em geral, um composto é considerado um substrato da P-gp quando apresenta uma razão de efluxo (ER) *in vitro* de 2-3, ou superior^[12]. Como afirmado anteriormente, o verapamil, o diltiazem e a digoxina são conhecidos substratos de P-gp. No entanto, os nossos dados obtidos em células Caco-2 não confirmam que estes fármacos antihipertensivos sejam substratos de P-gp por definição. Os resultados do transporte bidirecional do verapamil e diltiazem (classe 1) mostram uma sobreposição dos perfis de transporte de B para A e A para B e ER próximo de 1, o que revela ser a permeabilidade passiva a força motriz. Os valores de Papp não foram afetados pela adição do inibidor da P-gp e a ER permanece inalterada, sugerindo que não há influência da P-gp no transporte celular. Resultados obtidos em células Caco-2 com um inibidor da P-gp diferente (LY335979) confirmam a ausência de efeito de P-gp para fármacos de classe 1 no intestino^[13]. Estes resultados indicam que a absorção tanto do verapamil como do diltiazem é controlada pela sua difusão passiva e não pela P-gp. Apenas os resultados do fármaco de classe 3, digoxina, são indicativos de um substrato P-gp, com transporte no sentido B para A maior do que A para B e ER de 4,05. Os resultados obtidos com a digoxina validam igualmente o nosso modelo Caco-2 quanto à função e capacidade de inibição da P-gp. Demonstra-se que o transporte da digoxina, e não do verapamil ou do diltiazem, é afetado pela adição de GG918, resultando num retorno da ER à unidade.

Mas a questão permanece, que linhagem celular deve ser usada como modelo apropriado para determinar as razões de efluxo de fármacos? As experiências com verapamil, diltiazem e digoxina sugerem que o sistema de células Caco-2 pode ser um modelo apropriado para determinar o efeito de P-gp na absorção. No entanto, o efeito de um transportador observado no sistema de células Caco-2 pode não necessariamente ser observado noutro sistema de células^[10]. Os valores mais baixos de TEER das células Caco-2 tornam-as num sistema mais permeável, que acreditamos ser mais representativo do intestino humano. O verapamil, assim como os fármacos midazolam e diazepam, são frequentemente usadas como substratos modelo^{[2][12]}. No entanto, todos per-

question as our data suggest the transporter effects for class 1 compounds can be ignored. Consequently, for certain drugs considered to be “model” P-gp substrates, transporter interactions in the intestine may be difficult to predict.

Conclusion

The results, although preliminary, corroborate our hypothesis that P-gp plays a minimal and clinically irrelevant role in the transcellular transport of class 1 drugs like verapamil and diltiazem across Caco-2 cells, while digoxin, a class 3 drug, will be significantly affected by intestinal transporters like P-gp. Hence, the Caco-2 cell system seems appropriate to predict P-gp transporter interactions in the absorption for drugs considered to be “model” P-gp substrates in certain cellular systems or organs. Nevertheless, it is essential to identify the cases for which *in vitro* screening can lead to discordant human intestinal permeability predictions.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the Portuguese government grant FCT/SFRH/BD/31025/2006.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as a potential conflict of interest.

tencem à classe 1, colocando assim essa metodologia em questão uma vez que os nossos dados sugerem que podemos ignorar os efeitos de transporte para compostos de classe 1. Consequentemente, para determinados fármacos considerados como substratos “modelo” da P-gp, pode ser difícil prever as suas interações mediadas por transportadores no intestino.

Conclusão

Os resultados, embora preliminares, corroboram a nossa hipótese de que a P-gp possui um papel pouco significativo e clinicamente irrelevante no transporte transcelular dos fármacos de classe 1 como o verapamil e diltiazem em células Caco-2, enquanto que o fármaco de classe 3 digoxina foi significativamente afectado pelos transportadores intestinais como a P-gp. Deste modo, o sistema de células Caco-2 parece adequado para prever interações do transportador P-gp na absorção de fármacos considerados substratos “modelo” da P-gp em determinados sistemas celulares ou órgãos. Não obstante, é fundamental identificar os casos para qual o rastreio *in vitro* possa conduzir a previsões de permeabilidade intestinal humana discordantes.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo governo Português através da bolsa de doutoramento FCT/SFRH/BD/31025/2006.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há nenhuma relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como um potencial conflito de interesses.

References/ Referências

- [1] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability," *Pharmaceutical research*, vol. 12, no. 3, pp. 413–420, 1995.
- [2] I. S. O. Dosage, "Guidance for Industry Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and," *Drugs*, vol. FDA Guidan, no. August, p. 16, 2000.
- [3] Emea, "Guideline on the investigation of bioequivalence," *Eur. Med. Agency (...)*, vol. 1, no. January, pp. 1–27, 2010.
- [4] J. A. G. Morais and M. D. R. Lobato, "The new european medicines agency guideline on the investigation of bioequivalence," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 106, no. 3, pp. 221–225, 2010.
- [5] T. Prueksaritanont, X. Chu, C. Gibson, D. Cui, K. L. Yee, J. Ballard, T. Cabalu, and J. Hochman, "Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective.," *AAPS J.*, vol. 15, no. 3, pp. 629–45, 2013.
- [6] C. Y. Wu and L. Z. Benet, "Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 11–23, 2005.
- [7] K. Ito, H. Suzuki, T. Horie, and Y. Sugiyama, "Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 1559–1577, 2005.
- [8] C. Hilgendorf, G. Ahlin, A. Seithel, P. Artursson, A. Ungell, and J. Karlsson, "Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines ABSTRACT.," vol. 35, no. 8, pp. 1333–1340, 2007.
- [9] C. a Larregieu and L. Z. Benet, "Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery.," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 4, pp. 1335–44, 2014.
- [10] J. M. Custodio, C. Y. Wu, and L. Z. Benet, "Predicting drug disposition, absorption/ elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 6, pp. 717–733, 2008.
- [11] C. L. Cummins, L. Salphati, M. J. Reid, and L. Z. Benet, "In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 305, no. 1, pp. 306–314, 2003.
- [12] S. Design and D. Analysis, "Guidance for Industry Drug Interaction Studies," no. February, 2012.
- [13] X. Lin, S. Skolnik, X. Chen, and J. Wang, "Attenuation of intestinal absorption by major efflux transporters: Quantitative tools and strategies using a Caco-2 model," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 39, no. 2, pp. 265–274, 2011.